

Université de Sherbrooke

Interaction gènes-environnement dans le développement de la prééclampsie.

Par
François Leclerc
Programme de Sciences Cliniques

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph. D)
en Sciences cliniques

Sherbrooke, Québec, Canada
Mars 2018

Pr Guylain Boissonneault, Directeur de recherche, Département de Biochimie
Pr Jean-Marie Moutquin, Directeur de recherche, Département d'obstétrique-Gynécologie
Pr Julie Carrier, Évaluateur interne, Département de médecine
Pr Cathy Vaillancourt, Évaluateur externe
Pr Abdelouahed Khalil, Président du Jury, Département de médecine

RÉSUMÉ

Interaction gènes-environnement dans le développement de la prééclampsie.

Par

François Leclerc

Programmes de sciences cliniques

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en sciences cliniques, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Nous sommes exposés sur une base quotidienne au Bisphénol A (BPA). Des travaux antérieurs ont mis en lumière des effets cytotoxiques sur les cellules placentaires et la possible implication du BPA dans l'apparition de la prééclampsie. À de très faibles concentrations, le BPA induit une augmentation significative de l'apoptose et de la nécrose des cytotrophoblastes ainsi qu'une augmentation de l'expression et de la sécrétion du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α). Cependant, les mécanismes par lequel le BPA induit l'augmentation de la sécrétion du TNF- α et la cytotoxicité placentaire ne sont pas connus. Il a aussi été avancé que le BPA aurait la capacité, en tant que xénoestrogène, de pouvoir modifier l'expression des récepteurs de l'œstrogène et du récepteur CXCR4, un récepteur influençant la mobilité et la survie cellulaire dont l'expression est modulée par les œstrogènes. De telles modifications au niveau placentaire pourraient être en partie responsables dans le développement physiopathologique de la prééclampsie.

Pour vérifier cette hypothèse, deux groupes de participantes ont été étudiés : soit des femmes enceintes normotensives et des femmes atteintes par la prééclampsie (PE). Chaque participante a été recrutée dans le cadre du projet PÉRICARD. Le BPA a été quantifié dans l'ensemble des biopsies placentaires par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. L'expression des récepteurs de l'œstrogène et du récepteur CXCR4 a été mesurée par PCR en temps réel. Les niveaux sériques maternels de CXCL12, le ligand du récepteur CXCR4, ont été quantifiés par ELISA. L'effet du BPA sur l'expression des récepteurs de l'œstrogène et du récepteur CXCR4 a aussi été mesuré par PCR en temps réel sur un modèle de cellules placentaires. Finalement, ce même modèle fut utilisé afin de déterminer un possible mécanisme d'action du BPA et évaluer la capacité d'un anticorps à limiter les effets cytotoxiques du BPA.

Nos résultats ont permis d'observer une accumulation élevée du BPA dans le placenta de femmes ayant une grossesse avec PE. De plus, ils ont permis de faire ressortir une modification de l'expression de certains récepteurs de l'œstrogène et du récepteur CXCR4 dans les biopsies placentaires provenant de placentas prééclamptiques. Ces mêmes modifications ont aussi été mises en évidence sur des cellules placentaires normales exposées au BPA. De plus, il est apparu, sur un modèle de cellules en culture, que le maintien de l'activité du récepteur ERR γ par le BPA serait possiblement associé à l'augmentation de l'expression du TNF- α . Finalement, dans le même modèle de cellules primaires, l'ajout d'un anticorps semble être en mesure contrer les effets cytotoxiques du BPA.

Mots clés : Récepteurs de l'œstrogène, Récepteur CXCR4, Bisphénol A, Prééclampsie

SUMMARY

Genes-environment interaction in the development of preeclampsia

By
François Leclerc
Clinical sciences Program

A thesis presented to the Faculty of Medicine and Health Sciences in partial fulfillment of the requirements of the degree of Doctor of Philosophy in Clinical sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

We are exposed on a daily basis to Bisphenol A (BPA). Previous work has highlighted cytotoxic effects on placental cells and its possible involvement in the onset of preeclampsia. At very low concentrations, BPA induces a significant increase in apoptosis and necrosis of cytotrophoblast cells as well as increased expression and secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF- α). However, the mechanism by which BPA induces increased TNF- α secretion and placental cytotoxicity is not known. It has also been argued that BPA has the ability, as a xenoestrogen, to alter the expression of estrogen receptors and the CXCR4 receptor. Such changes in the placental level may be partly responsible for the pathophysiological development of preeclampsia.

To test this hypothesis, two groups of participants were formed : a control group and a group of women who developed preeclampsia. Each participant was recruited as part of the PERICARD project. BPA was quantified in all placental biopsies by gas chromatography coupled with mass spectrometry. The expression of the estrogen receptors and the CXCR4 receptor was measured in these same biopsies by real-time PCR. Maternal serum levels of CXCL12 were determined by ELISA. The effect of BPA on estrogen receptor and CXCR4 receptor expression was also measured by real-time PCR on a primary placental cell model. Finally, this same model was used to determine a possible mechanism of action of BPA and to evaluate the ability of an antibody to limit the cytotoxic effects of BPA.

Our results demonstrated a high accumulation of BPA in the placenta of pregnant women with preeclampsia. In addition, they demonstrated a change in the expression of certain estrogen receptors and the CXCR4 receptor in placental biopsies from preeclamptic placentas. These same changes have also been demonstrated on normal placental cells exposed to BPA. Moreover, on a cultured cell model, it appeared that the sustained activation ER γ receptor by BPA could be associated with the increase in the expression of the TNF- α . Finally, in the same primary cell model, the addition of an antibody appears to be able to counteract the cytotoxic effects of BPA.

Keywords : Estrogen receptors, CXCR4 receptor, Bisphenol A, Preeclampsia

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	ii
Summary.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	1
Introduction.....	2
La grossesse.....	2
<i>La fécondation et migration.....</i>	<i>2</i>
<i>Implantation.....</i>	<i>4</i>
Le placenta.....	4
<i>Développement placentaire.....</i>	<i>5</i>
<i>Fonction placentaire.....</i>	<i>8</i>
<i>Transport et métabolisme.....</i>	<i>8</i>
<i>Fonction endocrine.....</i>	<i>8</i>
<i>Protection.....</i>	<i>9</i>
Prééclampsie.....	10
<i>Définition.....</i>	<i>10</i>
<i>Étiologie.....</i>	<i>11</i>
<i>Physiopathologie.....</i>	<i>12</i>
<i>Le modèle en 2 stades.....</i>	<i>12</i>
<i>Défaut de placentation.....</i>	<i>13</i>
<i>Déficiences immunitaires.....</i>	<i>14</i>
<i>Polymorphismes et aberrations de l'expression génique.....</i>	<i>15</i>
<i>Les œstrogènes.....</i>	<i>15</i>
<i>Microchimérisme fœtal.....</i>	<i>16</i>
<i>Le stress oxydatif.....</i>	<i>17</i>
<i>Facteurs de risque.....</i>	<i>18</i>

<i>Gestion de la grossesse compliquée par la prééclampsie</i>	19
Le récepteur alpha de l'œstrogène (ERα)	20
<i>Rôle dans la grossesse</i>	20
<i>Rôle possible dans la prééclampsie</i>	22
Le récepteur bêta de l'œstrogène (ERβ)	23
<i>Rôle dans la grossesse</i>	23
<i>Rôle possible dans la prééclampsie</i>	24
Récepteur relatif de l'œstrogène gamma	25
<i>Rôle dans la grossesse</i>	25
<i>Rôle possible dans la prééclampsie</i>	27
Le récepteur GPER	28
<i>Rôle dans la grossesse</i>	28
<i>Rôle possible dans la prééclampsie</i>	29
Le récepteur CXCR4	30
<i>Rôle dans la grossesse</i>	30
<i>Rôle possible dans la prééclampsie</i>	31
Le Bisphénol A	31
<i>Historique</i>	31
<i>Structure</i>	32
<i>Législation</i>	32
<i>Exposition</i>	33
<i>Cinétique métabolique chez la femme enceinte</i>	34
Association entre le Bisphénol A et les complications de grossesses	35
Hypothèse et objectifs de recherche	36
Hypothèse	36
Objectif général	36
Objectifs spécifiques	37
Méthodologie	38
Population	38
Recrutement des participantes	38
Échantillonnage	39

Assignation des participantes.....	39
Devis employé.....	40
Prélèvements placentaires.....	41
Prélèvements sanguins.....	42
Quantification de transcrit des gènes des récepteurs de l'œstrogène et du récepteur CXCR4.....	42
<i>Extraction d'ARN.....</i>	<i>42</i>
<i>Synthèse d'ADN complémentaire.....</i>	<i>43</i>
<i>Réaction de PCR en temps réel.....</i>	<i>43</i>
Isolation et culture de cytotrophoblastes primaires.....	44
Immunofluorescence du récepteur CRXCR4 dans des cellules placentaires dans un modèle <i>in vitro</i>	45
Quantification de concentration sérique maternelle en CXCL12.....	46
Évaluation du BPA placentaire.....	48
<i>Procédure d'extraction.....</i>	<i>48</i>
<i>Analyse GC-MS.....</i>	<i>49</i>
Exposition des cellules placentaires primaire au Bisphénol A.....	50
Mesure de la viabilité cellulaire.....	51
Transfection.....	51
Migration cellulaire.....	52
Analyse statistique.....	52
Résultats.....	53
Objectif 1.....	54
Objectif 2.....	55
<i>Quantification de l'expression du récepteur CXCR4 au niveau placentaire.....</i>	<i>56</i>
<i>Quantification sérique maternelle du CXCL12.....</i>	<i>58</i>
Objectif 3.....	59
Objectif 4.....	61
<i>Modification de l'expression des récepteurs de l'œstrogène par le BPA.....</i>	<i>62</i>
<i>Modification de l'expression du récepteur CXCR4 par le BPA.....</i>	<i>65</i>
Objectif 5.....	66

Objectif 6.....67

Objectif 7.....71

Discussion.....73

Conclusion.....90

Perspectives.....91

Références.....92

Annexe 1.....103

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Principales hormones produites par le placenta et leurs fonctions.....	9
Tableau 2	Protéines ou molécules protectrices produites par le placenta.....	10
Tableau 3	Facteurs de risque de la prééclampsie.....	19
Tableau 4	Affinité des différents œstrogènes et du Bisphénol A pour les récepteur ER α et ER β	23
Tableau 5	Amorces utilisées	45

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Fécondation et migration.....	3
Figure 2 Développement placentaire.....	7
Figure 3 Le modèle de la prééclampsie en deux étapes.....	13
Figure 4 Schéma de concept de la prééclampsie.....	18
Figure 5 Mécanisme nucléaire et membranaire des récepteurs de l'œstrogène.....	21
Figure 6 Mécanisme d'action du récepteur ERR γ	27
Figure 7 Synthèse du Bisphénol A par condensation d'acétone et de phénol.....	32
Figure 8 Glucuronidation du Bisphénol A.....	36
Figure 9 Expression relative des récepteurs des œstrogènes.....	54
Figure 10 Expression relative et membranaire du récepteur CXCR4	57
Figure 11 Concentrations sériques maternelles de CXCL12.....	59
Figure 12 Concentrations placentaires de Bisphénol A.....	61
Figure 13 Expression relative des récepteurs des œstrogènes dans les cellules placentaires exposées au Bisphénol A	63
Figure 14 Expression relative de l'expression du récepteur CXCR4 et l'expression membranaire du récepteur CXCR4.....	65
Figure 15 Potentiel migratoire des cellules placentaires.....	67
Figure 16 L'effet du BPA au travers du récepteur ERR γ	69
Figure 17 L'effet de l'exposition au BPA sur l'expression du récepteur ERR γ et du TNF- α	70
Figure 18 Viabilité cellulaires des cellules exposées au Bisphénol A.....	71
Figure 19 Viabilité cellulaires des cellules exposées au Bisphénol A et à un anticorps dirigé contre le BPA.....	72
Figure 20 Schéma récapitulatif de l'effet du Bisphénol A sur les récepteurs des œstrogènes et son rôle potentiel dans la prééclampsie.....	89

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ANP	Facteur natriurétique auriculaire
Atk	Protéine Kinase B
BPA	Bisphénol A
Cm	Centimètre
COX 2	Prostaglandine-endoperoxyde synthase 2
CXCL12	Ligand CXCL12
CXCR4	Récepteur CXCR4
eNOs	Oxyde nitrique synthase endothéliale
ER	Récepteur de l'œstrogène
ERE	Éléments de réponse aux œstrogènes
ERRE	Éléments de réponse relatifs œstrogène
ER α	Récepteur alpha de l'œstrogène
ER β	Récepteur bêta de l'œstrogène
ERR γ	Récepteur relatif à l'œstrogène gamma
g	Gramme
GC/MC	Chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse
hCG	Hormone chorionique gonadotrope
INF- γ	Interféron gamma
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramme
MRD1	Glycoprotéine - P
mg	Milligramme
ng	Nanogramme
NO	Monoxyde d'azote
sFlt1	<i>Soluble fms-like tyrosine kinase 1</i>
TX A2	Thromboxane A2
TNF- α	Facteur nécrosant tumoral alpha
UDP	Uridine diphosphate
μ g	Microgramme
UGT	UDP-glucuronyltransférase
SLT1A	Sulfotransférase 1A
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

REMERCIEMENTS

Dans premier temps, je tiens aussi à remercier le Pr Guylain Boissonneault et le Pr Jean-Marie Moutquin pour m'avoir guidé pendant la rédaction de la présente thèse. Je tiens à remercier le Pr Aziz Aris pour m'avoir permis de réaliser ce projet dans son laboratoire.

Je tiens à remercier ma conjointe Karine C.-Turcotte, mes parents ainsi que ma famille immédiate pour leur support inconditionnel dans mes démarches académiques et leur encouragement dans la réalisation de ce projet de doctorat.

J'aimerais remercier l'équipe du service de la maternité pour leur collaboration, sans laquelle il aurait été impossible de réaliser ce projet. Finalement, j'aimerais aussi remercier l'équipe de la génétique biochimique sans qui les dosages biochimiques du Bisphénol A par chromatographie gazeuse auraient été impossibles.

INTRODUCTION

La grossesse

La grossesse est une suite chronologique synchronisée de processus biologiques débutant à la fécondation et prenant fin à l'accouchement. Une altération de ces processus et/ou une altération du synchronisme peuvent mener à différentes complications de grossesse. Les contaminants environnementaux sont des molécules ayant le potentiel d'induire de telles altérations (Robins *et al.*, 2011).

Le Bisphénol A (BPA) est l'un de ces contaminants pouvant induire des maladies de grossesse comme la prééclampsie en perturbant l'axe des œstrogènes. Les travaux de recherches décrits dans cette thèse portent sur les effets du BPA sur l'expression des récepteurs de l'œstrogène et du récepteur CXCR4, un récepteur membranaire activé par la liaison avec le CXCL12 jouant un rôle dans la mobilité et la viabilité cellulaire, dans le contexte de la physiopathologie de la prééclampsie.

La fécondation et migration

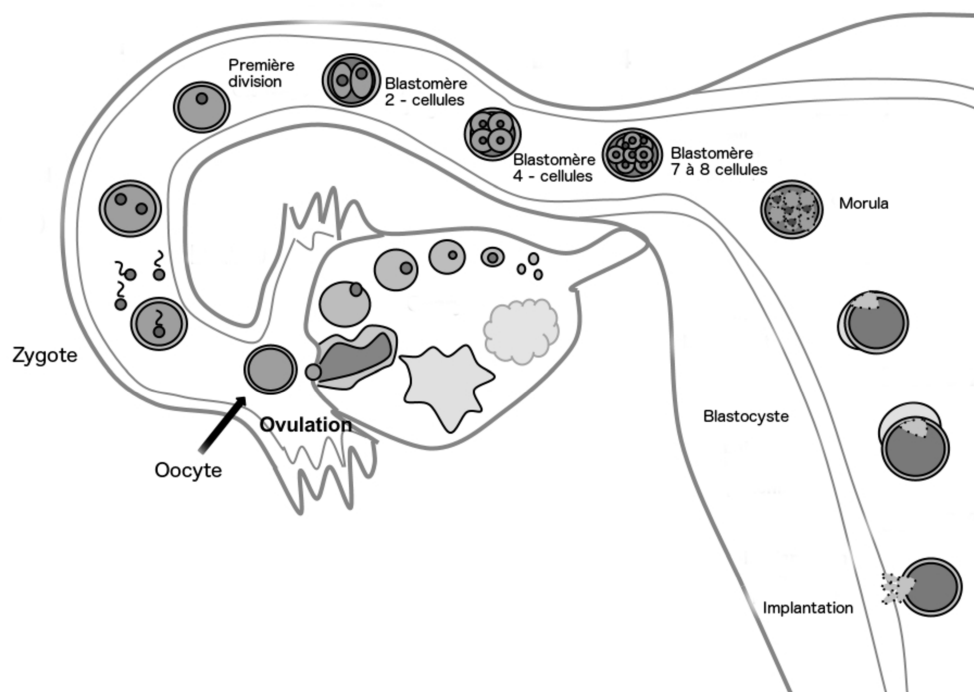
La première étape de la grossesse est la fécondation. Il y a la rencontre dans la trompe de Fallope entre le gamète mâle et le gamète femelle formant la première cellule diploïde (zygote) après la fusion des noyaux. C'est de cette première cellule diploïde que dérivera le fœtus ainsi que l'ensemble des structures nécessaires pour la grossesse.

Après la fécondation, le zygote entame sa migration jusqu'à son site d'implantation dans l'utérus. Pendant la migration, le zygote entreprend sa segmentation ; une suite de divisions cellulaires asynchrones et contrôlées. La première division prend un total de vingt-quatre heures et produit deux cellules filles identiques pluripotentes pour former le blastomère. Les cellules du blastomère se diviseront afin de former des cellules de plus en plus petites jusqu'au stade de 64 cellules. À ce stade, la masse cellulaire dérivée du zygote prend le nom de morula. Chez l'humain, un total de quatre-vingt-seize heures est nécessaire pour

atteindre ce stade.

Les cellules de la morula se divisent pour atteindre le stade de blastocyste. Le blastocyste entre dans la cavité utérine pour y flotter librement. C'est là que les premiers trophoblastes, des cellules étudiées dans le cadre de cette thèse, font leur apparition. Ces cellules entourent le blastocyste et c'est de cette couche cellulaire que dérivent les principales structures du placenta. À l'un des pôles de la sphère formée par les trophoblastes et le blastocyste (pôle embryonnaire), une masse de cellules du blastocyste demeure en contact avec le trophoblaste alors que de l'autre pôle, les trophoblastes et le blastocyste sont séparés par une cavité, appelée le blastocœle, remplie de liquide (Figure 1) (Rabineau *et al.*, 2014).

Figure 1
Fécondation et migration



Adapté avec permission de «Human Fertilization» par Ttrue12, 2012. Image sous licence CC BY-SA

Implantation

Le blastocyste rencontre l'épithélium de l'endomètre par le pôle embryonnaire aux jours 8 et 9 pour s'y ancrer partiellement où les trophoblastes s'y multiplient rapidement et se différencient. On observe la formation de deux couches. La couche interne est faite de cellules mononuclées, les cytotrophoblastes (Sadler, 2012). La couche externe est formée de cellules multinuclées sans séparation cytoplasmique. Cette couche forme le syncytiotrophoblaste. (Sadler, 2012).

L'étude de la division cellulaire chez ces deux couches de cellules nous a appris que ces couches dérivent l'une de l'autre. La présence de divisions cellulaires dans la couche interne de cytotrophoblastes et l'absence de division cellulaire dans le syncytiotrophoblaste indiquent que les cytotrophoblastes se divisent par mitose asymétrique avant de migrer et fusionner au syncytiotrophoblaste (Sadler, 2012).

Le syncytiotrophoblaste sécrète des enzymes protéolytiques désagréant le tissu endométrial (Rabineau *et al.*, 2014) afin de pénétrer l'endomètre. Ce faisant, il entraîne avec lui l'ensemble du blastocœle. Avant la fin de la deuxième semaine, le blastocyste s'est intégré dans le stroma endométrial et l'épithélium de l'endomètre recouvre presque entièrement celui-ci (Sadler, 2012 ; Rabineau *et al.*, 2014). Le développement placentaire pourra alors débuter.

Le placenta

Le placenta est un organe transitoire se développant dans les premiers stades de la grossesse et qui est expulsé à la suite du fœtus lors de l'accouchement. À terme, le placenta humain forme un disque plus ou moins rond d'un diamètre variant entre 15 et 20 cm et d'une épaisseur variant de 2 à 3 cm. À l'accouchement, son poids oscille entre 400 g et 600 g. D'un côté, le placenta s'ancre dans l'endomètre maternel et de l'autre côté, il est le point d'insertion du cordon ombilical. Sur les rebords, des structures se prolongent du côté fœtal pour former les membranes qui composent le sac amniotique.

Le placenta est irrigué par le sang maternel et agit comme barrière pour le sang fœtal. Il assure les échanges gazeux de l'oxygène et du dioxyde de carbone. Il est aussi responsable du passage d'éléments nutritifs de la mère vers le fœtus et de déchets métaboliques du fœtus vers la mère. Le placenta assure une fonction endocrine dans la production de différentes hormones nécessaires, entre autres, au maintien de la grossesse. Finalement, le placenta agit comme barrière protectrice.

Développement placentaire

Différents facteurs immunologiques, génétiques ou encore environnementaux peuvent perturber le développement placentaire. Ces perturbations résultent en complications comme le retard de croissance intra-utérin, le diabète de grossesse et la prééclampsie.

Le développement placentaire s'amorce dans la seconde semaine de gestation, lorsque le blastocyte s'est enfoui dans l'endomètre. Aux jours 11 et 12, le syncytiotrophoblaste poursuit la sécrétion d'enzymes protéolytiques et s'enfonce plus profondément (Rabineau *et al.*, 2014). Au pôle embryonnaire, des réseaux de lacunes se forment dans le syncytiotrophoblaste. En s'enfonçant, ce dernier va éroder les capillaires sanguins maternels (Sadler, 2012). Lorsque les lacunes du syncytiotrophoblaste entrent en contact avec les capillaires maternels érodés, la circulation utéroplacentaire débute (Rabineau *et al.*, 2014; Sadler, 2012). Au cours des jours 13 et 14, on observe la formation des premières villosités primaires. Le syncytiotrophoblaste continue de proliférer et des structures placentaires se forment. Le syncytiotrophoblaste projette des travées radiales entraînant du même coup la couche de cytotrophoblastes avec lui (Rabineau *et al.*, 2014) (Figure 2A).

Au début de la troisième semaine, les villosités primaires se développent et le mésenchyme de la lame choriale pénètre à l'intérieur de l'axe radial du cytotrophoblaste afin de former les villosités secondaires. À la troisième semaine et au début de la quatrième semaine, des ébauches de vascularisation apparaissent à l'intérieur des villosités secondaires afin de former les villosités tertiaires. Lorsque ces ébauches entrent en contact avec celles du reste

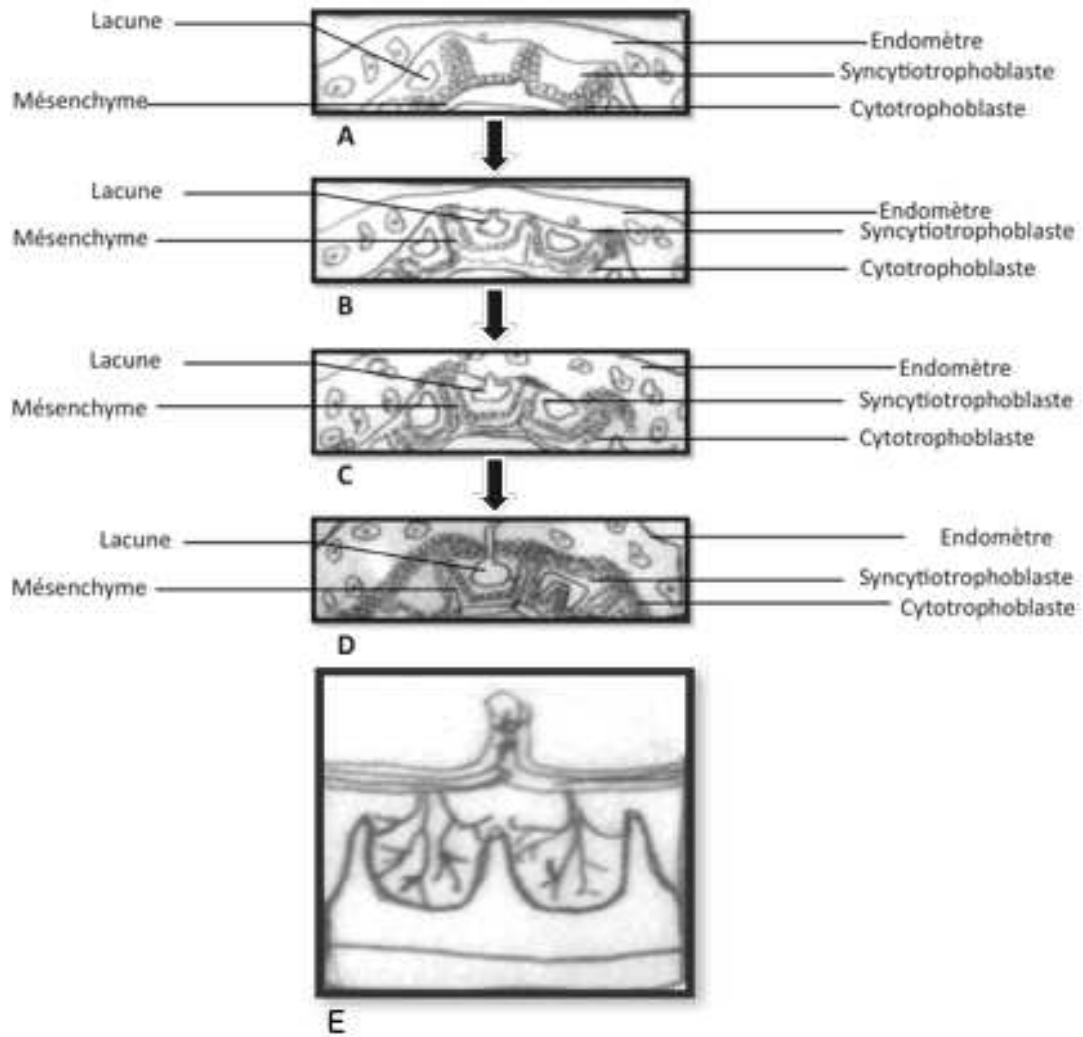
du mésenchyme extraembryonnaire, la circulation extraembryonnaire débute (Figure 2B). Pendant ce temps, les cytotrophoblastes poursuivent leur prolifération à l'extrémité de chaque colonne radiale qui traverse le syncytium (Figure 2C). Cette couche de cytotrophoblastes finit par refermer chacune des lacunes. Cette étape permet de former les chambres intervilluses (Figure 2C).

Au cours de la quatrième semaine, les villosités tertiaires du mésenchyme extraembryonnaire (chorion) se réorganisent en villosités primordiales placentaires. À partir de ces villosités, les villosités de deuxième ordre et les villosités terminales vont successivement se développer par bourgeonnement. Cette évolution s'accompagne d'une différenciation vasculaire. On y voit apparaître la veine centrale et les deux artérioles reliées par un réseau de capillaires (Figure 2D).

Pendant les semaines 8 à 10, une étape critique dans le développement placentaire se produit. Des cytotrophoblastes extravilloux envahissent les artères spiralées maternelles responsables d'alimenter en sang le placenta (Lyall *et. al.*, 2001). Cette invasion transforme la structure de ces vaisseaux de haute résistance à faible débit en vaisseaux de faible résistance à haut débit (Young *et. al.*, 2010).

À la fin du troisième mois, le placenta devient un organe discoïde attaché à la paroi utérine par la plaque basale alors que le cordon ombilical est attaché à la plaque chorale. Les membranes anioniques et chorioniques délimitent la cavité amniotique (Sadler, 2012). Au quatrième mois, une seconde vague d'invasion des cytotrophoblastes extravilloux a lieu (Lyall *et. al.*, 2001) marquant ainsi la fin de la prolifération des cytotrophoblastes. Les cellules demeurant se réorganisent pour former le septa intercotylédonaire (figure 2E). Le placenta a atteint sa forme définitive (Rabineau *et. al.*, 2014).

Figure 2
Développement placentaire



Fonction placentaire

Transport et métabolisme

Le transport d'éléments nutritifs est essentiel pour le développement du fœtus. Le transport peut être influencé par le flot sanguin utéroplacentaire et ombilical, la taille des chambres intervillieuses, le métabolisme placentaire, l'expression et l'activité des protéines de transport (Lager et Powell, 2012). Ces anomalies du transport sont généralement observées dans les complications de grossesse.

Pendant le premier trimestre de la grossesse, l'apport en nutriments est histiotrophique. Les cytotrophoblastes et le syncytiotrophoblaste collaborent pour phagocyter les différentes sécrétions de l'endomètre (Jones *et al.*, 2015). Lorsque le développement placentaire et embryonnaire le permet, l'apport en nutriments passe du mode histiotrophique au mode hémotrophique (Jones *et al.*, 2015). Les échanges se font alors par la membrane du syncytiotrophoblaste entre les deux circulations.

Fonction endocrine

Dans le contexte où le placenta est un organe transitoire, il est dépourvu de nerf (Gude *et al.*, 2004). Ainsi, beaucoup de communications entre la mère, le placenta et le fœtus sont donc assumées par des sécrétions hormonales. Le placenta joue un rôle central dans ces communications en occupant une fonction endocrine, paracrine et autocrine. Il est responsable entre autre de la production d'hormones (Tableau 1), de facteurs de croissance nécessaires au développement fœtal, de cytokines, de chemokines ainsi que de composés vasoactifs (Gude *et al.*, 2004).

Tableau 1

Principales hormones produites par le placenta et leurs fonctions

Hormone	Fonction
Œstrogènes	Implantation du placenta
	Invasion des trophoblastes
	Prolifération des trophoblastes
	Différentiation des trophoblastes
	Sécrétion endocrinienne
	Métabolisme cellulaire
	Adaptation immunologique
	Contrôle de la tension artérielle
Progestérone	Différentiation des cellules déciduales
	Maintient des fonction utérine
Facteur de croissance épidermique (EGF)	Prolifération des trophoblastes
	Invasion des trophoblastes
	Différentiation des trophoblastes
	Stimule la production de hCG
	Stimule la production de hPL
hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG)	Maintien du corpus luteum
	Prolifération cellulaire
	Différenciation cellulaire
	Invasion de trophoblastes
	Stimulation de la production de IGF-II
	Stimulation de VEGF
Somatomédine A (IGF-II)	Stimulation de l'expression de COX-2
	Stimulation de l'hydrolase de la gélatine par les trophoblastes
	Invasion des trophoblastes
	Migration des trophoblastes
Corticolibérine (CRH)	Favorise l'implantation placentaire
	Favorise l'adaptation immunitaire de la mère face à la grossesse
Somatomammotrophine chorionique humaine (hPL)	Modification du métabolisme maternel

Protection

Pendant la grossesse, l'embryon et ensuite le fœtus sont vulnérables aux menaces microbiennes en l'absence de système immunitaire. Le placenta agit telle une barrière contre les infections. Cette barrière est efficace contre la majorité des bactéries à l'exception de certains genres telles que *Listeria sp.* et la majorité des protozoaires. Cependant, cette barrière est souvent inefficace contre les virus (Gude *et. al.*, 2004). Une transmission verticale est observée lorsque les microbes traversent la barrière placentaire.

Les infections à transmission verticale ne sont pas les seules menaces contre lesquelles le placenta doit lutter. Aujourd'hui, plus que jamais, nous sommes exposés à de nombreux xénobiotiques. Ce sont des molécules étrangères à un organisme (non produites par lui-même ou encore ne provenant pas de son alimentation naturelle) qui sont polluantes et parfois toxiques à l'intérieur d'un organisme vivant, en très de faibles concentrations.

Afin de lutter contre les xénobiotiques et leurs effets sur la grossesse, le placenta exprime différentes protéines et complexes protéiques (Tableau 2) ayant pour but de diminuer la toxicité et l'élimination des xénobiotiques. Les principales protéines et complexes protéiques sont la protéine MRD1 (Gude *et. al.*, 2004), les dix isoformes du cytochrome P450 (Prouillac et Lecoeur, 2010) la glutathione S-transférase α and π , l'époxide hydrolase, la N-acétyltransférase et différentes isoformes de sulfotransférases (SULT1A1 et SULT1A3). De plus, le placenta exprime deux isoformes de l'UDP-glucuronyltransférase (UGT1A et UGT2B) (Collier *et. al.*, 2002) qui sont essentielles dans la métabolisation du BPA.

Tableau 2

Protéine ou molécule protectrices produites par le placenta

Molécule	Fonction
Glycoprotéine P (MDR1)	Transport actif permettant l'expulsion d'hormone
	Transport actif permettant l'expulsion de xénobiotiques
Protéine associée à la multirésistance aux médicaments (MRP)	Transport actif permettant l'expulsion de xénobiotiques
Protéine de résistance du cancer du sein (BCRP)	Transport actif permettant l'expulsion de xénobiotiques
Cytochrome P450	Oxydo-réduction de xénobiotiques
	Oxydo-réduction de toxines
	Oxydo-réduction de drogues
	Oxydo-réduction de médicaments
Glutathione S-transférase	Catalyse la conjugaison d'un groupement glutathione aux xénobiotiques
Époxide hydrolase	Catalyse l'hydrolase des époxides en trans-dihydrodiols
N-acétyltransférase	Catalyse le transfert d'un acétyl aux xénobiotiques
Sulfotransférases	Catalyse le transfert d'un sulfate aux xénobiotiques
UDP-glucuronyltransférase	Catalyse la conjugaison d'un groupement glucuronide aux xénobiotiques

Prééclampsie

Définition

La prééclampsie est définie comme étant une hypertension (chronique ou de novo) pendant

la grossesse ($\geq 140/90$ mm Hg) accompagnée d'une protéinurie supérieure ou égale à 300 mg sur collection urinaire sur une période de 24 heures ou son équivalent, après la 20^e semaine (Magee *et al.*, 2014). Chez les femmes préalablement en santé, cette complication touche entre 2% et 7% des grossesses en général. De plus, il s'agit de la principale cause de morbidité et mortalité périnatale (Sibai, 2003 ; Roberts et Gammill, 2005).

En fonction de la gravité de la maladie, des complications telles que l'œdème pulmonaire, des convulsions, une oligurie, une hyperuricémie, une thrombocytopénie, une élévation des enzymes hépatiques, de violentes migraines, des troubles visuels et un statut mental altéré peuvent subvenir (Sibai, 2003 : Magee *et al.*, 2014). Plus l'apparition des symptômes de la prééclampsie est précoce, plus le pronostic est mauvais (Sibai, 2003) et le risque de voir apparaître ces complications est élevé. La possibilité de développer un retard de croissance intra-utérin ou la prématurité augmente avec la présence du diagnostic de la prééclampsie (Al-Mulhim *et. al.*, 2005; Yücesoy *et. al.*, 2005) en conséquence du fait que ces complications de grossesse possèdent des origines partiellement communes.

Étiologie

Dans la Grèce antique, il était soutenu par les disciples d'Hippocrate que l'origine de la prééclampsie résidait dans un déséquilibre des humeurs (fluides biologiques) provoquant des dommages au foie, à la rate, à l'estomac, aux poumons et finalement à la tête (Bell, 2010). À la Renaissance, il fut observé que cette maladie touche plus fréquemment les primipares. Il était alors cru que la cause de la maladie résidait dans la rétention de l'écoulement des lochies provoquant de l'inflammation, des douleurs dans la tête, des convulsions, la suffocation et la mort (Bell, 2010). Le 19^e siècle voit apparaître la théorie de la toxémie gravidique où il était avancé que la cause de la prééclampsie était une accumulation démesurée d'éléments toxiques produits par le placenta dans le sang de la mère ce qui entraînait les dommages au foie, à la rate, à l'estomac, aux poumons et provoquait finalement des convulsions (Bell, 2010).

Les véritables avancées sont faites avec l'arrivée de la biologie cellulaire suivie de la

biologie moléculaire au 20^{ième} siècle. Aujourd'hui encore, l'étiologie exacte demeure inconnue et dans notre compréhension actuelle, la prééclampsie est plutôt un syndrome qu'une maladie. Il est désormais admis que différentes combinaisons de facteurs [une invasion déficiente du trophoblaste dans les vaisseaux utérins, une intolérance immunitaire entre le placenta et les tissus maternels, une adaptation déficiente du système cardiovasculaire, des anomalies génétiques (Sibai, 2003 : Aris *et al.*, 2009), une exposition à différents facteurs environnementaux (Aris *et. al.*, 2009)] en seraient responsables.

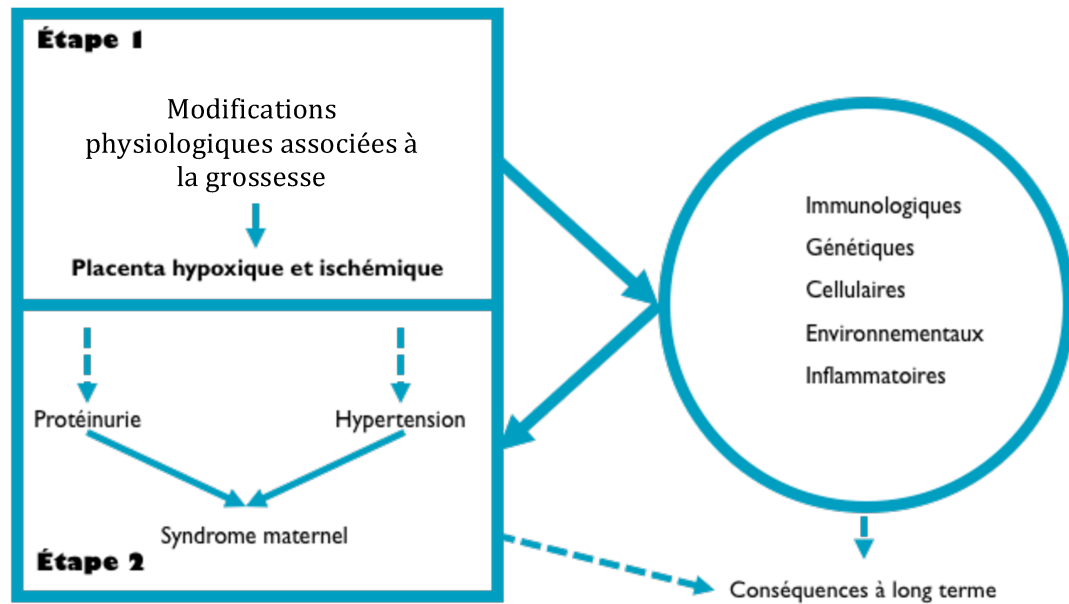
Physiopathologie

Le modèle en 2 stades

Au cours des dernières décennies, différents modèles de la physiopathologie de la prééclampsie ont été proposés, chaque modèle étant généralement une itération du modèle précédent qui n'arrive pas à décrire l'ensemble des cas d'apparition de la prééclampsie. Aujourd'hui, le modèle en 6 étapes de Redman et le ouvert en deux étapes décrit par Roberts et Hubel (2009) sont les plus acceptés. Au premier stade, des cycles d'hypoxie / oxygénation induisent la production de facteurs menant au deuxième stade; le syndrome maternel où les manifestations cliniques observables chez la mère apparaissent (Roberts et Hubel, 2009). Il est aussi décrit que l'hypoxie et l'ischémie placentaire ne sont pas suffisantes pour induire à elles seules le syndrome maternel. Il doit y avoir l'interaction de différents facteurs intrinsèques et environnementaux pour voir l'apparition des symptômes cliniques (Roberts et Hubel, 2009)(figure 3).

Figure 3

Le modèle de la prééclampsie en deux étapes, selon Roberts et Hubel, 2009.



En début de grossesse, des anomalies du développement du placenta, des anomalies dans l'adaptation du système immunitaire ainsi l'exposition à des facteurs environnementaux entraîne une hypoxie et un ischémie placentaire. À long terme, cela entraîne une protéinurie ainsi qu'une hypertension chez la mère. On considère ce moment comme le début du syndrome maternel.

Défaut de placentation

Au cours du développement normal de la grossesse, les artères spiralées sont envahies par les cytotrophoblastes (Lyall *et al.*, 2001) pour induire une transformation structurelle et fonctionnelle des artères spiralées (Hertig et Liere, 2010 ; Young *et al.*, 2010). Lors de ce remodelage, une sous population de trophoblastes remplace la couche de cellules endothéliales (Young *et al.*, 2010) en plus d'éliminer les cellules musculaires lisses entourant les cellules endothéliales des artères spiralées (Hertig et Liere, 2010). Ces artères deviennent insensibles aux agents vasoconstricteurs tels que l'angiotensine II et l'épinéphrine (Myatt et Webster, 2009). De plus, le volume sanguin circulant augmente d'environ 45 % (Myatt et Webster, 2009). Cet ensemble de changements transforme ces

vaisseaux sanguins de haute résistance à faible débit en vaisseaux de faible résistance à haut débit (Young *et al.*, 2010) dans le but de fournir un apport important de nutriments au fœtus en développement (Hertig et Liere, 2010).

L'une des hypothèse avancée lors d'une grossesse compliquée par la prééclampsie est que l'invasion des trophoblastes, nécessaire à la transformation artérielle, est incomplète (Myatt et Webster, 2009 : Roberts et Hubel, 2009). Le nombre de cytotrophoblastes qui envahissent les artères spiralées (Hertig et Liere, 2010) dont les diamètres finaux peuvent être jusqu'à 50% inférieur en comparaison aux femmes ayant une grossesse normale (Myatt et Webster, 2009). Cette anomalie peut mener à l'ischémie et l'hypoxie du placenta décrit dans le premier stade modèle de la prééclampsie en plus de laisser les artères spiralées contractiles (Hung *et al.*, 2001) et sensibles aux agents vasoconstricteurs contrairement aux grossesses normales (Myatt et Webster, 2009).

Déficiences immunitaires

Dans la prééclampsie, une interaction erratique entre les cellules NK maternelles et les cytotrophoblastes (Sibai *et al.*, 2005), une augmentation de la sécrétion de TNF- α (Sibai *et al.*, 2005 : Matthiesen *et al.*, 2005), une augmentation de la sécrétion d'INF- γ (Matthiesen *et al.*, 2005) ainsi qu'une augmentation de la sécrétion des cytokines inflammatoires sont observées. Le TNF- α induit l'apoptose et la nécrose des trophoblastes alors que l'INF- γ recrute les macrophages qui à leur tour sécrètent le TNF- α (Kaufmann *et al.*, 2003). Cette augmentation de l'apoptose et de la nécrose trophoblaste observée dans la prééclampsie perturberait le remodelage des artères spiralées.

En plus de contribuer à l'apoptose, ces déficiences immunitaires (augmentation de la sécrétion du TNF- α et d'INF- γ) induisent la transcription et le relâchement d'endothéline-1 (Sharma *et al.*, 2011) contribuant à l'augmentation de la tension artérielle observée au second stade du modèle. Dans la prééclampsie, le système immunitaire sécrète des anticorps anormaux dirigés contre des auto-antigènes, contre les récepteurs adrénergiques α_1 , β_1 et β_2 , contre la cardiolipine et la prothrombine (Elliott *et al.*, 2014).

Ces interactions erratiques avec des protéines régulatrices de la tension entraînent aussi l'hypertension artérielle.

Polymorphismes et aberrations de l'expression génique

Des facteurs génétiques ont été associés au développement de la prééclampsie. Il a été observé qu'un historique familial augmenterait les probabilités de développer la prééclampsie (Gude et al., 2004). Des outils de génomique à haut débit ont permis l'identification de polymorphismes d'au moins douze gènes (*F5*, *MTHFR*, *F2*, *ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *AGTR2*, *NOS3*, *TNF* (Laivuori, 2007), *STOX1* (Haram et al., 2014), *ER α* (Molvarec et al., 2007) et *ER β* (Maruyama et al., 2004) susceptibles d'être impliqués dans le développement de la prééclampsie. D'autre part, l'analyse de l'expression génétique placentaire a permis l'identification de 36 gènes d'intérêt n'ayant pas de polymorphisme, mais plutôt une aberration des niveaux d'expression (Founds et al., 2009). Cependant, ces polymorphismes et modifications de la régulation de l'expression ne se sont pas avérés spécifiques à la prééclampsie.

Les œstrogènes

Plusieurs hormones sont impliquées dans le développement à terme de la grossesse, cependant, dans le cadre de cette thèse, nous nous limiterons aux œstrogènes et plus particulièrement les récepteurs des œstrogènes.

Les œstrogènes et leurs récepteurs occupent différents rôles en fonction du stade de la grossesse et du tissu où ils sont exprimés. Leurs influences s'étendent de l'implantation jusqu'à l'accouchement. Au début de la grossesse, les œstrogènes participent à l'invasion des trophoblastes dans l'endomètre (Selam et al., 2001) et jouent donc un rôle dans la placentation. De plus, en fonction du récepteur activé, elles influencent la prolifération des cytotrophoblastes, ainsi que leur différenciation en syncytiotrophoblastes. Elles participent aussi à la régulation de la sécrétion endocrinienne, au métabolisme énergétique, à l'équilibre des dérivés actifs de l'oxygène, à l'immunité et au contrôle de la tension

artérielle. Les rôles des œstrogènes et xénoœstrogènes seront abordés avec plus de détails dans les sections abordant les récepteurs de l'œstrogène.

Microchimérisme fœtal

Le microchimérisme fœtal consiste en la déportation de trophoblastes et de fragments de trophoblaste sous forme de microparticules dans la circulation maternelle. Ce matériel biologique fœtal persiste dans l'organisme maternel pour plusieurs années et influence la santé de la mère. Dans le cadre des grossesses sans complications, des cellules ou des fragments cellulaires s'érodent du placenta et entrent dans la circulation maternelle pour y jouer un rôle dans l'adaptation immunitaire de la mère (Sargent *et al.*, 1996).

Dans les cas de prééclampsie, il a été observé que le microchimérisme fœtal est plus important. De plus, ces entités cellulaires sont généralement apoptotiques ou nécrotiques et elles ne joueraient plus leur rôle dans l'adaptation immunitaire de la mère, mais induiraient plutôt une dysfonction endothéliale ainsi qu'une réaction inflammatoire (Sargent *et al.*, 1996). Il a été suggéré que ces deux phénomènes puissent jouer un rôle dans l'apparition de l'hypertension artérielle et de la protéinurie.

Plusieurs mécanismes pourraient être responsables de cette déportation de matériel biologique placentaire. Cependant dans le cas de cette thèse, l'hypothèse du CXCR4/CXCL12 sera étudiée. L'axe de signalisation placentaire du CXCR4/CXCL12 est, entre autres, connu pour être responsable de la migration de cellules trophoblastiques lors de la placentation et du remodelage des artères spiralées (Ray *et al.*, 2012). Une perturbation de cet axe pourrait expliquer une partie de l'étiologie de la prééclampsie et l'apparition des symptômes du second stade de la prééclampsie.

Le stress oxydatif

Dans le cadre de la prééclampsie, un stress oxydatif important est observé. Ce stress

oxydatif est généré par l'hypoxie et l'ischémie placentaire suivie d'une rapide reperfusion du tissu (Hung *et al.*, 2001). En réponse à ce phénomène, on observe une augmentation de la sécrétion de TNF- α (Malek *et al.*, 2001) et l'activation des cellules endothéliales (Hung *et al.*, 2004) participant à l'apparition de la protéinurie observable dans la prééclampsie (Young *et al.*, 2010).

Dans une boucle de rétroaction positive, le stress oxydatif entraîne la production de TNF- α , qui à son tour entraîne la production locale d'espèces réactives de l'oxygène et d'endothéline-1 (Sharma *et al.*, 2011). Alors que les espèces réactives de l'oxygène contribuent directement au stress oxydatif, l'endothéline-1 provoque une vasoconstriction, une hypertension artérielle maternelle, une hypoxie et une ischémie placentaire. L'augmentation de la tension artérielle augmente la sécrétion du facteur natriurétique auriculaire (ANP); un agent vasodilatateur sécrété dans le but de rétablir une tension artérielle normale (Minegishi *et al.*, 1999) et de perfuser à nouveau le tissu hypoxique.

Un autre effet du stress oxydatif est l'augmentation de la sécrétion de l'interleukine 6, TGF- β et de TNF- α (Malek *et al.*, 2001). Une fois relâché dans la circulation maternelle, ces facteurs inflammatoires participent à la dysfonction endothéliale vasculaire observée dans la prééclampsie. De plus, l'augmentation l'interleukine 6, du TGF- β et de TNF- α résultent en l'apoptose de cellules du syncytiotrophoblaste qui s'érodent plus facilement (Chen *et al.*, 2010) et peuvent migrer dans la circulation maternelle.

Ces différents facteurs mentionnés interagissent donc ensemble (figure 4) dans la physiopathologie de la prééclampsie et dans l'expression clinique de celle-ci chez la mère.

Figure 4

Schéma conceptuel de la prééclampsie

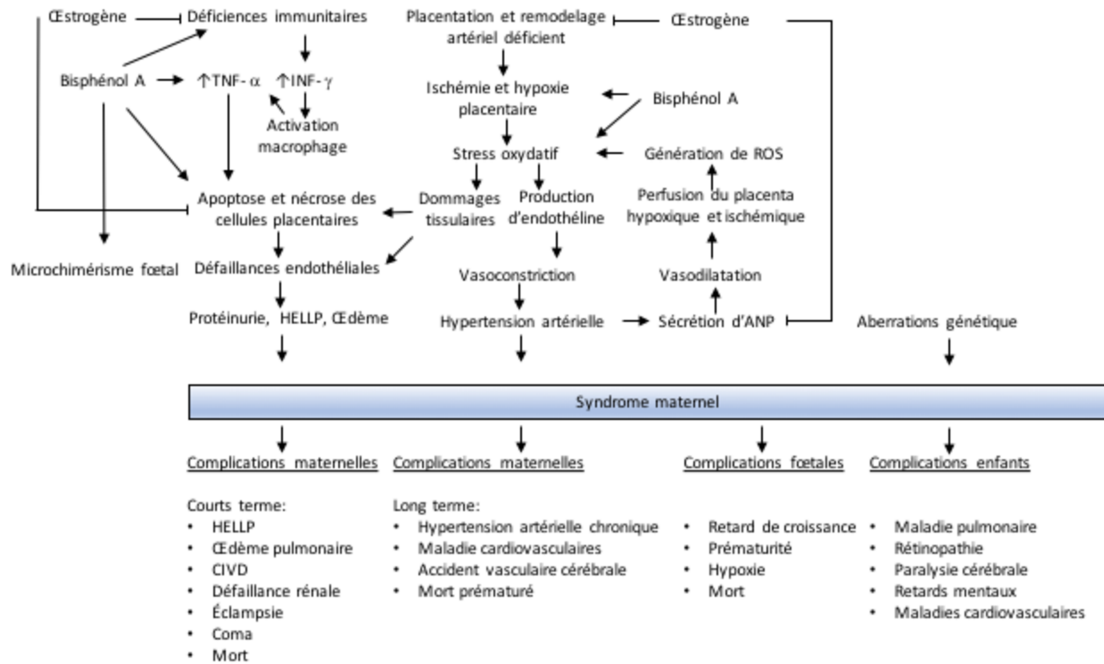


Schéma conceptuel proposé de la physiopathologie de la prééclampsie suite à la revue de littérature effectuée dans le cadre de ce travail de thèse.

Facteurs de risque

Il est possible de catégoriser les facteurs de risque en deux ensembles distincts. Dans un premier temps, les facteurs de risque présents avant le début de la grossesse et dans un deuxième temps, les facteurs de risque dont l'apparition se fait pendant la grossesse (Tableau 3).

Tableau 3

Facteurs de risque de la prééclampsie

Facteurs de risque avant la grossesse	Facteurs de risque pendant la grossesse
Nulliparité	Infection urinaire pendant la grossesse
Grossesse multiple	Maladie parodontale
Obésité	Triploïdie - Trisomie
Hypertension chronique	Retard de croissance intra-utérin
Diabète	Grossesse gémellaire
Syndrome antiphospholipide	
Trombophilie	
Maladie auto-immune	
Maladie rénale	
Exposition limité au sperme du père	
Âge de la mère à la conception inférieur à 20 ans	
Âge de la mère à la conception supérieur à 35 ans	
Mère née prématurée ou ayant un faible poids à la naissance	
Historique de prééclampsie lors de grossesse précédente	
Historique familiale de prééclampsie	
Historique de retard de croissance intra-utérin	
Historique de mortinatalité	

Facteurs de risque de la prééclampsie selon (Barton et Sibai, 2008; Bartsch *et al.*, 2016; Chaiworapongsa *et al.*, 2014)

Gestion de la grossesse compliquée par la prééclampsie

Suite au diagnostic de prééclampsie, un suivi de grossesse rapproché est fait. Ces examens ont pour but d'évaluer la gravité de la maladie et mettre sur pied une stratégie de gestion de la grossesse. Des examens hématologiques sont faits, les niveaux de protéinurie ainsi que la tension artérielle sont vérifiés (Chaiworapongsa *et al.*, 2014). Finalement, un examen complet du fœtus est fait afin de vérifier son état de santé et s'assurer de l'absence de détresse (Chaiworapongsa *et al.*, 2014). À la lumière de ces résultats, une stratégie de gestion de la grossesse est mise en place afin de limiter les risques pour la santé de la mère et du fœtus. Cette stratégie se base le fait que les risques pour la mère et le fœtus à poursuivre la grossesse doivent être inférieures par rapport au bénéfice pour le fœtus à poursuivre la grossesse. Des examens à intervalles rapprochés seront effectués afin de s'assurer de l'absence des complications suivantes :

- Hypertension sévère non contrôlée (symptômes sévères persistants en dépit des médicaments)
- Syndrome HELLP (Hémolyse, atteinte hépatique, faible numération des plaquettes)
- Œdème pulmonaire
- Insuffisance rénale significative
- Décollement prématuré du placenta normalement inséré
- Éclampsie
- Rupture des membranes
- Retard croissance intra-utérin grave
- Hydramnios persistant
- Détresse fœtale

Dans le cas où ces complications apparaissent, l'induction artificielle du travail peut devenir la seule solution afin d'éviter la mort de la mère et celle du fœtus. Les symptômes se résorbent généralement dans les jours suivants après l'accouchement.

Le récepteur alpha de l'œstrogène (ER α)

Le récepteur alpha de l'œstrogène (ER α ou ERS1) est un récepteur hormonal nucléaire de 66 kD activé par les différents composés œstrogéniques endogènes, les œstrogènes exogènes et différents facteurs de croissance (Molvarec *et al.*, 2007). Ce gène est situé sur le bras long du chromosome 6 (6q25.1) (Molvarec *et al.*, 2007).

Rôle dans la grossesse

Le récepteur alpha de l'œstrogène (ER α) est un récepteur nucléaire possédant une affinité différente pour les multiples formes de ligand œstrogénique. De façon classique, ces œstrogènes migrent à travers les membranes pour se lier au récepteur. Le complexe ligand — récepteur se lie aux éléments de réponse aux œstrogènes (ERE), des séquences génomiques régulatrices des gènes cibles, pour induire une réponse génomique (figure 5B).

Un mécanisme secondaire est aussi connu. Une fraction des récepteurs ER α exprimés est

transloquée dans la membrane cytoplasmique suite à des modifications post-transcriptionnelles. À l'heure actuelle, il est avancé que l'activation des récepteurs ER α membranaires induit une réponse cellulaire rapide en opposition aux réponses génomiques produites par l'activation du ER α nucléaire. Suivant l'activation membranaire, une activation de l'enzyme eNOS ainsi que l'activation de la voie des MAP-Kinase sont observées (figure 5A). La voie 5c sera décrit plus loin dans ce travail.

Figure 5

Mécanismes nucléaires et membranaires des récepteurs de l'œstrogène.

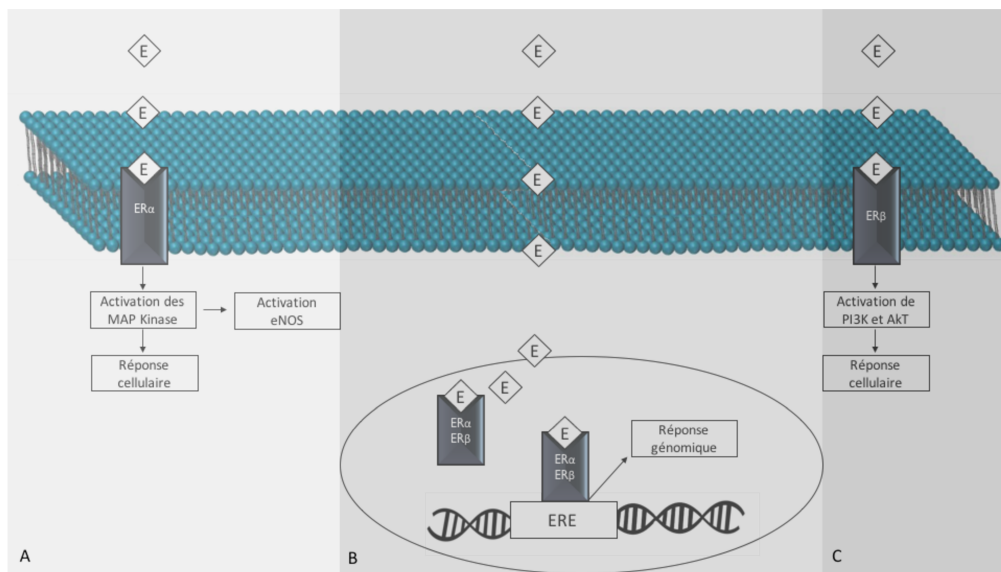


Figure 5) Mécanismes nucléaires et membranaires des récepteurs de l'œstrogène. A) Mécanisme membranaire du récepteur ER α . B) Mécanisme nucléaire des récepteurs ER α et ER β . C) Mécanisme membranaire du récepteur ER β .

Dans l'endomètre, le récepteur ER α est nécessaire à l'implantation du placenta. De plus, son activation participe à la régulation de l'expression des récepteurs de la progestérone participant ainsi à l'inhibition des contractions utérines et la modulation du système immunitaire de la mère. La présence et l'activation de ER α permettent le développement du placenta et de par son action sur la régulation de l'expression des récepteurs de la progestérone (Schultz *et al.*, 2003) participe au maintien de la quiescence utérine ce qui empêche les contractions de l'utérus pendant la grossesse.

Dans le placenta en développement, le récepteur ER α est exprimé majoritairement dans les cytotrophoblastes et il est très peu voire non exprimé dans le syncytiotrophoblaste (Bukovsky *et al.*, 2003). L'activation du récepteur ER α dans les cytotrophoblastes provoque leurs divisions ainsi que leurs différenciations cellulaires (Bukovsky *et al.*, 2003) afin de former le syncytiotrophoblaste. Au niveau vasculaire, l'activation du récepteur entraîne la sécrétion de VEGF (Gargett *et al.*, 2002), un facteur de croissance dont le rôle principal est la stimulation de la prolifération des cellules endothéliales et par le fait même la croissance des vaisseaux sanguins.

En plus de participer à la prolifération et la différenciation de certains types cellulaires placentaires et vasculaires, le récepteur ER α joue un rôle dans la fonction endocrine du placenta. Le récepteur ER α participe à la régulation de l'enzyme CYP19 (Kumar *et al.*, 2009), une aromatasase permettant entre autre la conversion de l'androstènedione et de la testostérone, respectivement, en estrone et estradiol.

Rôle possible dans la prééclampsie

Un polymorphisme nucléotidique de type T-A de ce récepteur a été observé chez les femmes atteintes de prééclampsie (Molvarec *et al.*, 2007). Ce même polymorphisme fut aussi associé à différentes maladies cardiaques. Cependant, d'après les connaissances actuelles, le mécanisme impliquant ce polymorphisme dans la prééclampsie demeure très peu connu. Il est cependant permis d'assumer que ce polymorphisme joue un rôle dans l'apparition de l'hypertension et des autres anomalies cardio-vasculaires observées dans la prééclampsie.

Dans les cas de prééclampsie, une augmentation de l'expression du récepteur ER α a été observée. En sachant qu'une diminution des niveaux d'œstrogène entraîne une augmentation de l'expression du récepteur, cette augmentation observée pourrait être une simple compensation pour la diminution de la sécrétion d'œstrogènes observée dans la prééclampsie (Yin *et al.*, 2013). Cela pourrait altérer les processus de prolifération et maturation cellulaires ainsi que la régulation de l'expression de différents éléments comme

l'enzyme CYP19 ou le récepteur CXCR4.

Le récepteur bêta de l'œstrogène (ER β)

Le récepteur bêta de l'œstrogène (ERS2 – ERS β - ER β) est un récepteur hormonal nucléaire de 530 acides aminés faisant 59,2 kDa. Ce gène est situé sur le chromosome 14 (14q23.2).

Rôle dans la grossesse

Ce récepteur de l'œstrogène partage une très grande homologie avec le récepteur ER α et on le retrouve principalement localisé au niveau du noyau. Une fraction marginale des ER β est aussi retrouvée à la membrane cytoplasmique. Le mécanisme d'action du récepteur ER β nucléaire est similaire au récepteur ER α où seules les gènes cibles diffèrent (fig 5B, p.19). Au niveau membranaire une grande similarité est aussi observable. Lorsqu'il est activé, le récepteur ER β entraîne l'activation de la voie de PI3K (Levin, 2009) et par le fait même, la voie de l'AkT (fig 5C). Il est aussi à noter que les affinités pour les différentes formes de l'œstrogène du récepteur ER β ne sont pas les mêmes que pour le récepteur ER α (Tableau 4). Cela combiné aux différences dans les gènes cibles activées laisse présager des rôles différents pour ce récepteur liant les mêmes ligands que le récepteur ER α .

Tableau 4

Affinité des différents œstrogènes et du Bisphénol A pour les récepteur ER α et ER β

Estrogène	ER α [IC50 (nM)]	ER β [IC50(nM)]
Estrone	11,2	8,9
Estradiol	112,2	446,7
Estriol	11	35
Bisphénol A	11200	16400

Le rôle récepteur de l'œstrogène bêta est souvent considéré comme antagoniste à celui du récepteur ER α . N'étant généralement pas impliqué dans les processus prolifératifs, il joue souvent un rôle dans la maturation cellulaire et dans la modulation de l'effet du récepteur

ER α .

Dans le placenta, si le récepteur ER α est presque exclusivement distribué dans le cytotrophoblaste où le récepteur ER β est pratiquement absent, l'inverse est observé dans le syncytiotrophoblaste (Bukovsky *et al.*, 2003). L'expression de ER β permet le contrôle de la prolifération des cytotrophoblastes et la maturation du syncytiotrophoblaste (le syncytiotrophoblaste est un syncytium formé par la multiplication des cytotrophoblastes) (Bukovsky *et al.*, 2003).

L'expression du ER β dans les cellules endothéliales des villosités placentaires promeut l'expression de l'enzyme COX-2 et la sécrétion de molécules modifiant le tonus vasculaire (Su *et al.*, 2009). Il a été suggéré que cette participation de l'expression de COX-2 entraîne l'augmentation de la thromboxane A2 (TxA2), un agent vasoconstricteur (Su *et al.*, 2009). Au niveau vasculaire, l'activation du récepteur entraîne la sécrétion de VEGF favorisant ainsi l'angiogenèse.

Rôle possible dans la prééclampsie

Dans la prééclampsie, la présence de polymorphismes au niveau du récepteur ER β est observée chez les femmes possédant un historique familial d'hypertension chronique (Maruyama *et al.*, 2004). La présence de ce polymorphisme n'était pas observée chez les femmes atteintes de prééclampsie qui n'avaient pas d'historique familial d'hypertension (Maruyama *et al.*, 2004). Le récepteur ER β , tout comme le récepteur ER α , est un facteur de risque dans l'hypertension, une composante majeure de la prééclampsie. Il est cependant impossible d'affirmer que les polymorphismes du récepteur ER β sont responsables de la prééclampsie sachant que ces polymorphismes ne sont pas systématiquement présents dans la prééclampsie.

Une augmentation de l'expression du récepteur ER β est observée chez les femmes atteintes de prééclampsie (Schiessl *et al.*, 2005) et est suspectée de perturber la production hormonale placentaire (Schiessl *et al.*, 2005). Une augmentation de l'expression du

récepteur pourrait entraîner la surproduction de molécules vasoconstrictrices via la voie des COX-2. Finalement, cela pourrait aussi favoriser l'augmentation de l'expression de VEGF, un autre phénomène observé *in vivo* dans la prééclampsie.

Récepteur relatif de l'œstrogène gamma

Le récepteur relatif de l'œstrogène gamma (ERR3 - NR3B3 - ERR gamma - ERR γ) est un récepteur nucléaire orphelin encodé sur le chromosome 1 (1q48) et possède un poids moléculaire de 51 kDa.

Rôle dans la grossesse

Le récepteur relatif à l'œstrogène gamma (ERR γ) est un récepteur nucléaire ayant pour ligand des molécules œstrogéniques exogènes. Ce récepteur est le membre le plus exprimé dans le placenta de la famille des récepteurs relatifs à l'œstrogène (Takeda et al., 2009). L'ensemble des fonctions biologiques du récepteur ERR γ n'est pas encore connu, cependant le mécanisme d'activation l'est. Les ligands œstrogéniques migrent par diffusion au travers des membranes jusqu'au noyau afin de se lier à un premier site de liaison. Alors que chez les récepteurs ER α et ER β , le complexe ligand - récepteur entraîne la liaison à l'ADN suivie d'une réponse cellulaire, on observe l'inverse avec le récepteur ERR γ (figure 6A). De manière générale, le récepteur ERR γ est activé de manière constitutive en absence de ligand (figure 6B). Lorsqu'il y a une interaction avec un ligand, cela entraîne la désactivation du récepteur. Une exception à ce mécanisme est connue, la liaison du Bisphénol A maintient une activation constante du récepteur ERR γ (figure 6C).

Ce récepteur a été associé à différents rôles dans la cellule. Il a été démontré que le récepteur ERR γ agit comme facteur de transcription sensible à l'oxygène lui conférant un rôle dans la différenciation du cytotrophoblaste en syncytiotrophoblaste (Luo *et al.*, 2014). De plus, il a été démontré par la même équipe que le récepteur ERR γ est impliqué dans la régulation de *KCNQ1*, *KCNE1* et *KLK1*, des éléments essentiels dans la différenciation du

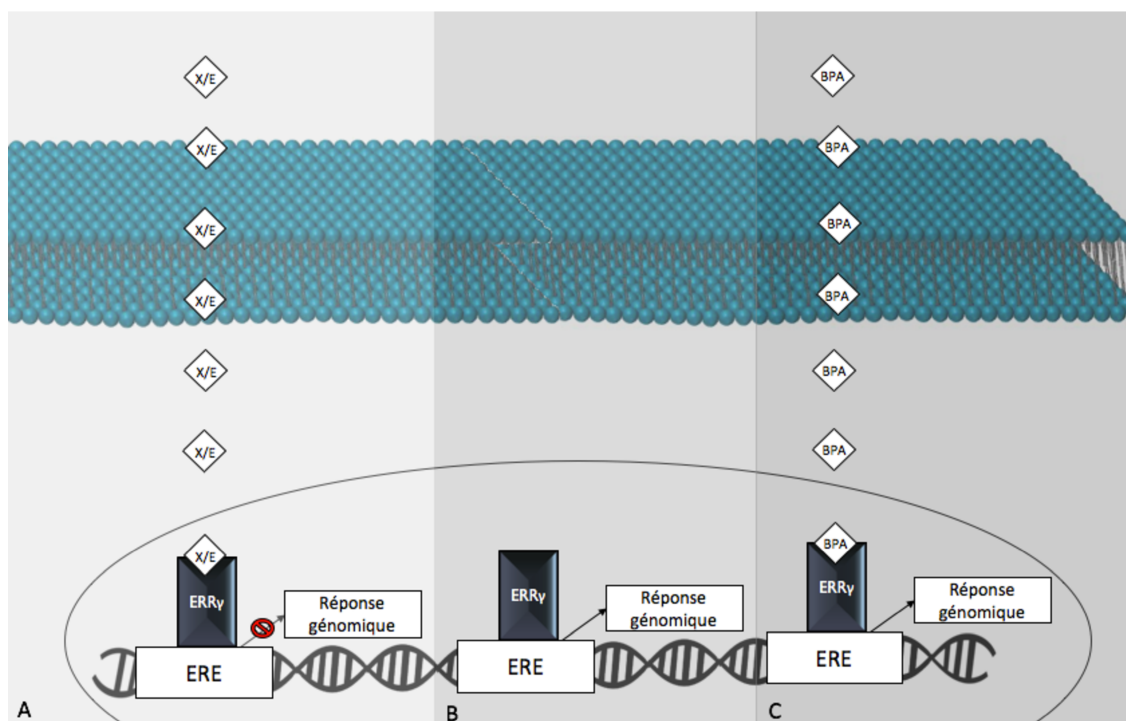
cytotrophoblaste en syncytiotrophoblaste (Luo *et al.*, 2014). Le récepteur ERR γ participe à la régulation des gènes *CYP11B1* et *CYP11B2* qui codent respectivement pour la 11- β -Hydrolase et l'aldostérone synthase; deux enzymes de la production de l'aldostérone (Luo *et al.*, 2014). Aussi l'expression et l'activation de ce récepteur ont été associées à certaines maladies cardiovasculaires (Luo *et al.*, 2014).

Le récepteur ERR γ est associé au métabolisme énergétique des cellules placentaires. Il a été démontré que ce récepteur participe à la régulation du métabolisme mitochondrial du glucose et de l'oxydation des acides gras. De plus, il serait impliqué dans la priorisation du métabolisme du glucose par rapport aux acides gras afin de maintenir des niveaux stables d'ATP au sein du cytotrophoblaste (Poidatz *et al.*, 2012). Au niveau de la mitochondrie, ce récepteur participe à l'équilibre d'espèces réactives de l'oxygène (Poidatz *et al.*, 2012 : Deblois et Giguère, 2013). En effet, un niveau plus élevé d'activation de ce récepteur favorise la génération d'espèces réactives de l'oxygène.

Par un mécanisme encore inconnu, le récepteur ERR γ entraîne l'inhibition de la prolifération et de l'invasion des cytotrophoblastes (Luo *et al.*, 2014). Un phénomène d'inhibition similaire est observé dans le développement vasculaire. Finalement, l'activité de ce récepteur est associée à des perturbations de l'immunité (Perry *et al.*, 2012).

Figure 6

Mécanisme d'action du récepteur $ERR\gamma$.



A) Inhibition de l'activité du récepteur $ERR\gamma$ lorsqu'un ligand se complexe avec le récepteur. B) Activité constitutive du récepteur $ERR\gamma$. C) Maintien de l'activité du récepteur $ERR\gamma$ lorsque le Bisphénol A (BPA) se complexe avec le récepteur $ERR\gamma$.

Rôle possible dans la prééclampsie

L'activation du récepteur $ERR\gamma$ est associée à une panoplie de rôles physiologiques. La plupart de ces rôles peuvent être impliqués dans la physiopathologie de la prééclampsie où une augmentation de son expression est constatée.

Une modification de l'expression de ce récepteur au niveau placentaire pourrait affecter la prolifération et l'invasion des cytotrophoblastes, sa maturation et sa capacité à jouer son rôle adéquatement en altérant la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste (Luo *et al.*, 2014)^a. De plus, une augmentation de son expression implique une augmentation de l'expression de *KCNQ1*, *KCNE1* et *KLK1*, ce qui pourrait une fois de plus perturber la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes

(Luo *et al.*, 2014)^b.

L'hypertension artérielle est l'une des composantes centrales dans la physiopathologie de la prééclampsie. L'augmentation de l'expression du récepteur ERR γ dans les glandes surrénales maternelles provoque une augmentation de la production de la 11- β -hydrolase et l'aldostérone synthase ; deux enzymes responsables de la synthèse de l'aldostérone. L'augmentation de la sécrétion de l'aldostérone entraîne une réabsorption de sodium et d'eau au niveau rénal ce qui a pour conséquence d'augmenter la volémie et la tension artérielle, une des manifestations de la prééclampsie.

De plus, l'augmentation de l'expression de ERR γ perturberait le métabolisme énergétique des cellules placentaires et favoriserait une augmentation du stress oxydatif. Cette modification de l'expression du récepteur ERR γ inhiberait la prolifération et l'invasion des cytotrophoblastes (Luo *et al.*, 2014)^a. Une augmentation de l'expression causerait aussi une diminution de la prolifération des cellules vasculaires. Finalement, il est possible d'affirmer que cela favoriserait des perturbations de l'immunité (Perry *et al.*, 2012).

Le récepteur GPER

Le récepteur GPER (GPR30) est un récepteur hormonal membranaire de 375 acides aminés (42,3 kDa) faisant partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ces récepteurs sont formés de sept domaines transmembranaires dont l'activation par un ligand déclenche des voies internes de transduction du signal et, finalement, les réponses cellulaires. Le récepteur GPER est activé par les différents composés ostrogéniques et il est encodé sur le bras court du chromosome 7 (7p22.3).

Rôle dans la grossesse

Le récepteur GPER est un récepteur de l'œstrogène connu aussi sous le nom de GPR30. Contrairement à la famille des récepteurs ER ou encore des récepteurs ERR, le GPER est un récepteur membranaire situé au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Le

mécanisme d'action de ce récepteur est légèrement différent des autres. Le mécanisme d'action classique des œstrogènes implique la migration des œstrogènes au travers des membranes pour se lier au récepteur nucléaire pour induire une régulation génique. Dans le cas du récepteur GPER, les œstrogènes se lient au récepteur présent sur le réticulum endoplasmique afin de provoquer une réponse cellulaire. Cette réponse cellulaire se traduit par l'activation de la voie de l'Atk (Li *et al.*, 2016) qui elle, favorise la survie cellulaire, la prolifération cellulaire, la migration cellulaire, l'angiogenèse (Manning et Cantley, 2007) l'inhibition de l'apoptose induite par le stress oxydatif (Kanda et Watanabe, 2003) ainsi que la production de l'oxyde nitrique (NO) (Dimmeler *et al.*, 1999).

Au niveau placentaire, plus particulièrement au niveau du cytotrophoblaste, l'activation du récepteur GPER favorise la prolifération cellulaire (Li *et al.*, 2016), un phénomène important pour le développement et le maintien du syncytiotrophoblaste. De plus, l'activation de ce récepteur favorise la migration cellulaire, un phénomène essentiel dans l'invasion des cytotrophoblastes dans les artères spiralées à 10^{ième} et 16^{ième} semaine. Pendant, le développement placentaire, un certain niveau de stress oxydatif est toujours présent. L'activation du récepteur GPER confère cependant une résistance aux trophoblastes face au stress oxydatif en activant la transcription de Bcl-2 et de la cycline D (Kanda et Watanabe, 2003) favorisant leurs viabilité.

À proximité des cellules vasculaires, l'activation du récepteur GPER joue un rôle dans la sécrétion de monoxyde d'azote via la régulation de la eNOs (Dimmeler *et al.*, 1999). Ainsi le GPER et les cellules l'exprimant jouent un rôle dans la régulation de la tension artérielle en modifiant le tonus vasculaire.

Rôle possible dans la prééclampsie

De par sa capacité à activer la voie de Akt, une modification de l'expression GPER a le potentiel de jouer un rôle dans la physiologie de la prééclampsie. Dans les faits, une diminution de l'expression placentaire du récepteur GPER a été observée chez les femmes atteintes de prééclampsie. Cette diminution de l'expression a été associée à une

augmentation de l'apoptose des cellules trophoblastiques (Li *et al.*, 2016). Cela pourrait provoquer une diminution des quantités de NO accessible et favoriser l'hypertension.

Le récepteur CXCR4

Le récepteur CXCR4 est un récepteur membranaire dont l'activation se fait par la liaison avec le CXCL12. Ce récepteur est codé sur le bras du deuxième chromosome (2q22.1) et est composé de 352 acides aminés pour un poids moléculaire de 39,8 kDa.

Rôle dans la grossesse

Le récepteur CXCR4 est un récepteur qui a, entre autres, comme régulateur d'expression les œstrogènes. Il a pour seul ligand la chimiokine CXCL12 (aussi nommée SDF-1). Le CXCL12 existe sous 3 isoformes différentes et chaque isoforme peut être retrouvée sous la forme monomérique ou dimérique (Ray *et al.*, 2012). L'interaction avec le monomère du CXCL12 avec le récepteur CXCR4 favorise l'activation de la voie Akt (Ray *et al.*, 2012). Lorsque la forme dimérique du CXCL12 se lie au CXCR4, le CXCR4 activé promeut la migration cellulaire par le recrutement de la β -arrestine 2 (Sun *et al.*, 2002).

Le CXCL12 et le récepteur CXCR4 sont connus pour être exprimés dans des cellules trophoblastiques (Wu *et al.*, 2004) et cette expression diminue au cours de la grossesse (Yun, 2006). Dans les premiers moments de la grossesse, l'interaction CXCR4 avec le monomère du CXCL12 est importante pour la prolifération cellulaire des cytotrophoblastes. L'activation de la voie de l'Akt par le CXCR4 confère une résistance au stress oxydatif pendant la grossesse. L'activation du récepteur CXCR4 par la forme dimérique du CXCL12 permet la migration de cellules placentaires et l'invasion des artères spiralées (Yun, 2006).

D'un point de vue vasculaire, l'expression du récepteur CXCR4 permet la prolifération cellulaire et la migration cellulaire (Manning et Cantley, 2007). Il participe à l'angiogenèse (Manning et Cantley, 2007) placentaire et ainsi au soutien de la grossesse.

Rôle possible dans la prééclampsie

Une modification de l'expression à la hausse ou à la baisse du récepteur CXCR4 pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie de la prééclampsie. Une diminution de son expression pourrait affecter la prolifération cellulaire et diminuer la résistance des cellules au stress oxydatif qui est anormalement élevé dans les cas de prééclampsie. Cela pourrait aussi affecter l'invasion des cellules trophoblastiques dans les artères spiralées. Une augmentation de l'expression du récepteur CXCR4 pourrait favoriser le microchimérisme fœtal et induire l'activation des cellules endothéliales, un phénomène observable dans la prééclampsie.

Le Bisphénol A

Historique

Le xénoestrogène Bisphénol A (BPA) est un xénobiotique attirant l'attention de la communauté scientifique, des organismes de régulation nationaux ainsi que du grand public. Ce xénoestrogène inquiète pour deux raisons. C'est une molécule produite à très grande échelle et de nombreux effets sur la santé humaine sont suspectés en raison de ses caractéristiques de perturbateur endocrinien.

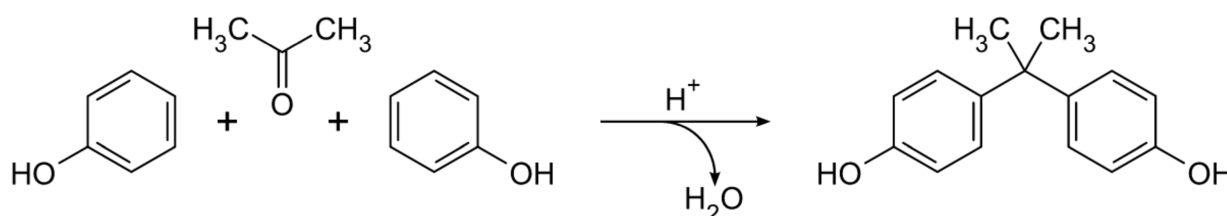
Découvert en 1891, le BPA fut synthétisé industriellement pour la première fois en 1923 comme intermédiaire dans la fabrication de résine époxy. Dans les années 1930, une similarité entre les structures du Bisphénol A et l'œstrogène est remarquée. Des études ont été menées afin d'évaluer le potentiel du BPA dans le rôle d'œstrogène de remplacement. Si la production du BPA pour des usages thérapeutiques n'a jamais abouti, la production de BPA pour l'industrie des plastiques n'a jamais cessé.

Structure

La première synthèse du BPA date de 1891. Elle a été faite en effectuant la condensation de deux moles de phénol et d'une mole d'acétone en présence d'un catalyseur, l'acide chlorhydrique concentré. Dans ces conditions, le BPA et les sous-produits sédimentent au fond du bain réactionnel. Le BPA doit ensuite être purifié. Cette méthode est toujours utilisée.

Figure 7

Synthèse du Bisphénol A par condensation d'une molécule d'acétone et deux molécules de phénol.



Réaction de synthèse du Bisphénol A par condensation à partir de deux molécules de phénol et d'une molécule acétone.

Législation

Le Canada a pris position sur l'exposition au BPA au terme de son évaluation en août 2008. *La Direction des aliments de Santé Canada* conclut « que l'exposition actuelle au BPA provenant des matériaux d'emballage des aliments ne pose pas de risque pour la santé de la population en général, y compris pour la santé des nouveau-nés et des nourrissons. » (Gouvernement du Canada, 2014). Des incertitudes quant au potentiel du Bisphénol A d'induire des effets neurologiques et comportementaux sont toutefois soulevées. Une modification de la *Loi canadienne sur la sécurité des produits de consommation* interdit la fabrication, l'importation et la vente des biberons de polycarbonate qui contiennent du 4,4'-isopropylidènediphénol (Bisphénol A) (Gouvernement du Canada, 2010) seulement. Aucun changement officiel ou législatif n'a été entrepris au Canada depuis. En réponse aux inquiétudes du grand public face aux effets potentiels du BPA sur la santé humaine, les

industries utilisant le BPA dans leurs procédés d'emballage travaillent activement à trouver des solutions de rechange dans les emballages de préparations pour les nourrissons (Gouvernement du Canada, 2014).

Exposition

Comme mentionnée, l'industrie du BPA en est une qui s'est développée au cours des dernières décennies. Le BPA entre maintenant dans la production de nombreux plastiques rencontrés dans notre vie quotidienne. Il est utilisé dans la fabrication de verres correcteurs, de disques compacts, de lentilles de caméra ou encore de vaisselles incassables et de plats réutilisables grâce à ses excellentes caractéristiques physiques. On le retrouve dans la fabrication de résines époxy. Le bisphénol A–diglycidyl éther est l'une de ces résines et elle est utilisée pour couvrir l'intérieur des boîtes de conserves alimentaires. Le BPA est aussi utilisé comme un retardateur de flamme dans certains plastiques ou encore comme un stabilisateur et un antioxydant dans les polychlorures de vinyle (PVC) utilisés dans la fabrication de certains gants jetables, de tuyauterie ou encore différents types de revêtements extérieurs et de planchers. Finalement, on le retrouve dans les papiers thermiques principalement utilisés dans l'impression de reçus de caisse.

En 2002, il est estimé que l'exposition quotidienne au BPA est de 1,6 µg/kg/jour pour les nourrissons, 1,2 µg/kg/jour pour les enfants de 4 à 6 ans et 0,4 µg/kg/jour pour les adultes. La Grande-Bretagne a pour sa part estimé l'exposition des Britanniques au BPA à 0,83 à 0,87 µg/kg/jour pour les nourrissons, alors que l'estimation pour les adultes est de 0,36 à 0,38 µg/kg/jour (Vandenberg *et al.*, 2007)

Suite à ces différentes expositions, on retrouve le BPA dans une multitude de tissus biologiques. En Allemagne une étude rapporte une concentration moyenne de BPA dans le sang de femmes enceintes de 3,1 ng/mL (Schönfelder *et al.*, 2002). Des résultats similaires ont été démontrés par Yamada *et al.* (2002) qui a étudié une population japonaise où des concentrations moyennes de BPA de 2,24 ng/mL ont été observées dans le sang de femmes enceintes. Un autre groupe de recherche au Japon a déterminé une concentration moyenne

de 1,4 ng/mL dans le sérum de femmes enceintes (Ikezuki *et al.*, 2002).

Dans le sang fœtal, des concentrations de 2,3 ng/mL (Schönfelder *et al.*, 2002) et de 2,2 ng/mL (Ikezuki *et al.*, 2002) sont mesurées. Toutefois, il est à noter que dans ces deux différentes études, aucune mention n'a été faite concernant les complications de grossesse. Le BPA est aussi retrouvé dans le placenta. Des concentrations de BPA variant de 0,7 à 34,9 ng/g (Jiménez-Díaz *et al.*, 2010), et une concentration moyenne de 11,2 ng/mL (Schönfelder *et al.*, 2002) ont été mesurées. Un groupe canadien a trouvé une concentration moyenne placentaire de 12,6 ng/mL (Cao *et al.*, 2012). Le BPA ne s'accumule pas uniquement dans le sérum maternel et fœtal ainsi que dans le placenta. Il est aussi retrouvé dans le sérum de femmes non enceintes, le liquide folliculaire et le liquide amniotique (Ikezuki *et al.*, 2002 ; Edlow *et al.*, 2012).

Cinétique métabolique chez la femme enceinte

La principale source d'exposition de l'être humain au BPA passe par l'alimentation et lorsqu'un aliment contaminé par le BPA est ingéré, le BPA est absorbé à partir du tube digestif. Il est acheminé vers le foie où il sera métabolisé par la voie de la glucuronidation. Au cours de cette réaction, l'uridine diphosphate glucuronyltransférase catalyse le transfert d'un acide glucuronique au bisphénol A. Il en résulte la formation d'un uridine diphosphate (UDP) ainsi que d'une molécule de BPA-glucuronide. Sous cette forme, la solubilité du BPA est grandement augmentée, ce qui permet son élimination par la voie urinaire. La demi-vie du BPA chez l'humain est inférieure à 6 heures (Völkel *et al.*, 2002) (Figure 5). La réaction inverse est aussi possible et est catalysée par la bêta-glucuronidase (Edlow *et al.*, 2012). L'acide glucuronique conjugué au BPA est transféré sur l'UDP. Au final, cette réaction entraîne la libération d'un BPA libre et actif et d'un UDP-acide glucuronide.

Ces deux voies métaboliques coexistent aussi au niveau placentaire. L'expression de cette voie métabolique permet l'élimination, dans une certaine mesure, du BPA au niveau placentaire. Il est à noter que la glucuronidation du BPA ne se fait pas au niveau fœtal dû à l'absence d'expression des enzymes nécessaires au niveau hépatique (Nahar *et al.*, 2013).

Le BPA est donc métabolisé et partiellement éliminé chez la mère au niveau hépatique ainsi qu'au niveau placentaire, cependant, il n'est pas métabolisé au niveau fœtal.

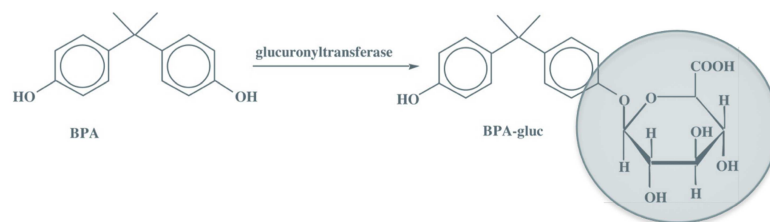
Association entre le Bisphénol A et les complications de grossesse

La présence du BPA dans les échantillons biologiques est bien décrite. Une étude a démontré l'effet apoptotique et nécrotique du BPA, à de très faibles concentrations, sur les cellules placentaires (Benachour et Aris, 2009). Le BPA entraîne l'apoptose à des concentrations de 0,02 µg/mL et la nécrose à des concentrations de 0,0002 µg/mL. Une autre conséquence du BPA est l'augmentation de la sécrétion de TNF-α à des concentrations de 0,0002 µg/mL.

Des niveaux élevés de BPA dans le sérum ont été associés à une baisse de sécrétion de FSH chez la femme non enceinte (Hanaoka *et al.*, 2002). Des concentrations plus élevées en BPA ont aussi été associées au syndrome Stein-Leventhal (Takeuchi et Tsutsumi, 2002) et au syndrome de Stein-Leventhal combiné avec l'obésité (Takeuchi *et al.*, 2004). Le syndrome de Stein-Leventhal est une ne maladie endocrinienne qui touche les femmes et qui se caractérise par une élévation du taux des androgènes et une anovulation. L'accumulation du BPA a aussi été associée à des avortements spontanés (Sugiura-ogasawara *et al.*, 2005) et des anomalies du caryotype (Yamada *et al.*, 2002). De plus, l'exposition au BPA serait corrélée avec une augmentation du risque de prématurité (Cantonwine *et al.*, 2010).

Figure 8

Glucuronidation du Bisphénol A



Hypothèse et objectifs de recherche

La prééclampsie est une complication grave de la grossesse caractérisée par une hypertension artérielle et une protéinurie. Le Bisphénol A est un contaminant environnemental auquel nous sommes exposés et qui a le potentiel de perturber différents mécanismes sous la gouverne des œstrogènes. Ces perturbations pourraient favoriser l'hypertension et favoriser des phénomènes observables dans la physiopathologie de la prééclampsie. Le BPA pourrait ainsi jouer un rôle dans l'apparition de complications de grossesses comme la prééclampsie.

Hypothèse

L'hypothèse de ce travail de recherche est que le BPA pourrait s'accumuler fortement dans le placenta ce qui aurait des effets sur l'expression des récepteurs oestrogéniques et le récepteur CXCR4 favorisant l'apparition de la prééclampsie.

Objectif général

Démontrer l'effet du BPA sur l'expression des récepteurs oestrogéniques et du récepteur CXCR4 au niveau placentaire et le lien avec la prééclampsie, et confirmer les altérations observées par des études *in vitro* impliquant le trophoblaste.

Objectifs spécifiques

1. Identifier les niveaux d'expression de récepteurs trophoblastiques de l'œstrogène ($ER\alpha$, $ER\beta$, $ERR\gamma$ & GPER) lors de grossesses normales et de grossesses compliquées par la prééclampsie chez des femmes de la région de l'Estrie
2. Identifier les niveaux d'expression du récepteur CXCR4 placentaire, un récepteur dont l'expression est tributaire de l'œstrogène, ainsi que son ligand, le CXCL12, lors de grossesses normales et grossesses compliquées par la prééclampsie chez des femmes de la région de l'Estrie.
3. Déterminer la concentration en Bisphénol A dans les échantillons placentaires des

femmes dont la grossesse fut compliquée par la prééclampsie ou non.

4. Mesurer l'effet du BPA sur l'expression des récepteurs de l'œstrogène et du récepteur CXCR4.
5. Évaluer la modification du potentiel migratoire des cellules placentaires par le BPA.
6. Déterminer par quel mécanisme le BPA entraîne un effet sur la viabilité des cellules placentaires.
7. Déterminer la capacité d'un anticorps à contrer les effets toxiques du Bisphénol A sur les cellules placentaires.

MÉTHODOLOGIE

Population

Lors de ce projet de recherche, la population cible était l'ensemble des femmes enceintes de l'Estrie. La population étudiée, cependant, se limitait aux femmes enceinte présentant ou non une prééclampsie accouchant au CHUS – Fleurimont au cours de l'année 2014 et 2015.

Recrutement des participantes

Le recrutement des participantes pour ce projet de recherche a été fait en accord avec le comité d'éthique à la recherche sur les êtres humains du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. Toutes les participantes ont été recrutées au CHUS-Fleurimont du CIUSSS de l'Estrie - CHUS afin de faire partie de la cohorte PÉRICARD.

Le formulaire d'information et de consentement, approuvé par le comité d'éthique à la recherche sur les êtres humains du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, a été remis et lu à chaque participante. Le projet PERECARD « prééclampsie, retard de croissance fœtale et maladie cardiovasculaire ultérieure » (PERECARD) est une étude portant sur les risques de maladies cardiovasculaires à la suite d'une prééclampsie chez les femmes enceintes de la région de l'Estrie. Ce projet de recherche a démarré en 2004 et les présents travaux de recherche s'imbrique dans cette étude.

Lors du recrutement, les préjudices tout comme les inconvénients probables, autant physiques que moraux, ont été clairement énoncés. De plus, il a été clairement énoncé à toutes les participantes devant un témoin que la participation au projet de recherche n'apportera aucun avantage médical ou monétaire. Il a été clairement mentionné aux candidates recrutées ainsi qu'au témoin leur droit de refuser de participer à cette étude, leur droit de se retirer de l'étude à n'importe quel moment. Lors du recrutement, il a été mentionné aux participantes ainsi qu'à leur témoin présent que la non-participation ou l'abandon de la participation pendant la durée du projet de recherche PÉRICARD ne

modifieraient en rien le plan de traitement et ne modifieraient en rien la qualité des soins reçus. Finalement, un moment de réflexion a été accordé avant la signature du formulaire de consentement. Un consentement écrit, libre et éclairé a été ainsi obtenu lors du recrutement.

La confidentialité des informations a été assurée par un système de codification et d'anonymisation des informations. Les échantillons codifiés ont été conservés sous verrous et dans des locaux à accès réservé. Toutes les données reliées à ce projet sont et demeurent strictement confidentielles.

Échantillonnage

Un échantillonnage de convenance a été utilisé lors de cette étude afin de faire face au caractère multifactoriel de la prééclampsie ainsi qu'à sa faible incidence. Un calcul de taille d'échantillon pour comparaison de moyennes a été utilisé en considérant les analyses de résultats à effectuer. En tenant compte d'une taille d'effet de 0,8, une erreur alpha de 0,05 ainsi qu'une puissance de 80 %, une taille d'échantillon minimale de 20 participantes a été déterminée. Les participantes ont été recrutées au Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke - Fleurimont. Ce site a été sélectionné pour des raisons de faisabilité. Cela permettait d'exploiter les mécanismes de collecte des échantillons au service de maternité déjà mis en place dans le cadre de projets antérieurs. De plus, cela permettait la collecte des échantillons biologiques dans les meilleurs délais et conditions possibles.

Assignment des participantes

Dans le cadre des expérimentations du devis cas-témoins deux groupes de participantes ont été formés, un groupe de femmes avec une grossesse normale (groupe témoin) et un groupe de femmes avec une grossesse compliquée par la prééclampsie (groupe prééclampsie). Chaque groupe est constitué de 20 participantes.

Afin d'être incluse, une participante devait être atteinte ou non de prééclampsie, être âgée

de 18 ans et plus, accoucher au CHUS – Fleurimont, avoir un IMC inférieur à 25. Les participantes souffrant d'hypertension chronique, d'insuffisance rénale chronique, de maladies auto-immunes et de diabète étaient exclues. De plus, les participantes ayant un âge à la conception ≥ 40 ans, souffrant d'obésité, étant atteint d'une autre complication de grossesse ou de désordres hormonaux étaient aussi exclues de l'étude.

Les participantes ayant un reçu un diagnostic de prééclampsie par l'équipe médicale du CHUS-Fleurimont étaient assignées au groupe prééclampsie sinon elles étaient assignées au groupe témoin. Les participantes ont été sélectionnées de façon à ce qu'il n'y ait pas de différence significative entre les deux groupes au niveau de l'âge lors de la conception, l'indice de masse corporelle et la parité. Sachant que le mode d'accouchement (voie basse ou par césarienne) n'influence pas les paramètres à l'étude, le mode d'accouchement n'a pas été pris en compte dans la sélection et le recrutement des participantes. De plus, il est à noter que les participantes ont tous accouchées à terme, n'ont pas connu de complication à l'accouchement et tous les nouveau-nés n'avaient aucun problème de santé apparent à la naissance.

Dans le cadre des expérimentations du modèle *in vitro*, cinq participantes ayant des caractéristiques similaires aux femmes du groupe contrôle ont été sélectionnées. Pour des raisons de faisabilité et faciliter la logistique des expériences, le mode d'accouchement par césarienne a été favorisé dans le cadre du modèle *in vitro*. Une fois de plus, il est à noter que les participantes n'ont pas connu de complication à l'accouchement et tous les nouveau-nés n'avaient aucun problème de santé apparent à la naissance.

Devis employé

Une combinaison de deux devis a été utilisée dans le cadre de ce projet de recherche. Dans un premier temps, un devis de type cas-témoin a été utilisé. Il a permis de mesurer les niveaux d'expression des récepteurs des œstrogènes ($ER\alpha$, $ER\beta$, $ERR\gamma$ & $GPER$) ainsi que du récepteur CXCR4, un récepteur régulé par les œstrogènes. Ce devis a aussi été utilisé pour quantifier les niveaux de CXCL12, le ligand d'intérêt pour le récepteur CXCR4.

Finalement, le devis de type cas-témoins a été utilisé pour déterminer les niveaux d'accumulation du Bisphénol A dans le placenta de femmes atteintes ou non de prééclampsie.

Les niveaux d'expression des récepteurs (ER α , ER β , ERR γ , GPER & CXCR4), les niveaux d'accumulation de BPA ainsi que les niveaux sériques maternels en CXCL12 pourront être comparés entre le groupe témoin et le groupe prééclampsie. Le choix du devis cas-témoins est justifié par la faible incidence de la prééclampsie soit de 1,8 % en Estrie (Aris, 2014a) et son caractère multifactoriel.

Afin d'évaluer l'effet du Bisphénol A sur l'expression de gènes œstrogéniques (ER α , ER β , ERR γ , GPER & CXCR4) des cellules placentaires et la prééclampsie, un modèle expérimental *in vitro* sera utilisé. Ce modèle permettra d'intervenir sur des cellules placentaires en les exposant directement à différentes concentrations de Bisphénol A. De plus, ce modèle *in vitro* permettra d'évaluer la capacité d'un antagoniste du Bisphénol A à renverser les effets toxiques de ce dernier. L'utilisation de ce modèle se justifie par l'impossibilité d'intervenir directement chez des participantes enceintes pour des raisons éthiques et techniques. De plus, des limitations de l'utilisation de modèles animaux en conséquence des différences dans l'ADME du BPA (Avissar-whiting *et al.*, 2011) en comparaison avec l'humain et l'absence de modèle animal fiable pour la prééclampsie justifient l'utilisation d'un modèle expérimental *in vitro*.

Prélèvements placentaires

Dans le cadre du devis cas-témoin, une biopsie placentaire a été prélevée. Un maximum de trente minutes s'écoulait entre la fin de l'accouchement et le prélèvement des échantillons en laboratoire. Malgré que cela puisse représenter une limite, une biopsie de 3 cm² est recueillie entre la plaque basale et la plaque chorionique, au niveau du point d'implantation du cordon. Une attention particulière est apportée afin d'éviter les zones d'infarctus et de thrombose. Les biopsies ont été rincées dans de la saline physiologique afin d'éliminer le maximum de sang et les traces de coagulation. L'excédent de solution est égoutté et

absorbé sur du papier absorbant. Les biopsies sont conservées dans une solution inhibitrice des ARNase (RNA Later, Quiagen USA) et conservées en ultra congélation (-80°C) jusqu'à l'analyse.

Dans le cadre du devis *in vitro*, des échantillons placentaires ont été prélevés. Un maximum de trente minutes s'écoulait entre la fin de l'accouchement et le prélèvement des échantillons en laboratoire. Les échantillons prélevés avaient une masse variant entre 35 et 40 grammes. Tout comme dans le cadre du devis cas-témoins, les échantillons sont prélevés entre la plaque basale et la plaque chorionique et ce le plus près possible du point d'implantation du cordon. Une attention très particulière est apportée afin d'éviter les zones d'infarctus et de thrombose. Ces échantillons prélevés sont ensuite utilisés pour l'isolation cellulaire et expérimentation dans le cadre du modèle *in vitro*.

Prélèvements sanguins

Avant l'accouchement, un prélèvement sanguin est fait pour chaque participante. La ponction sanguine a été effectuée à partir de la veine antecubitale. Tous les échantillons sanguins ont été recueillis dans des tubes BD Vacutainer de 10 mL en verre (Franklin Lakes, NJ, USA). Afin d'obtenir la phase sérique, les tubes ont été laissés à température pièce pendant trente minutes afin de laisser le sang complet coaguler. Ensuite, le tube a été centrifugé à 800 x g pendant 10 minutes à une température pièce. Dix millilitres de sang complet ont permis de récolter en moyenne 5 à 6,6 mL de sérum maternel. Le sérum a été aliquoté dans des tubes pour un volume maximal d'un millilitre par tube. Les aliquotes de sérums ont été conservés à - 80 °C en attendant l'analyse.

Quantification de transcrit des gènes *ERα*, *ERβ*, *ERRγ*, *GPER* et du récepteur *CXCR4*

Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN a été effectuée avec Trizol Reagent (Invitrogen Life Sciences, États-Unis). Afin d'extraire les ARN des biopsies placentaires, des sections 100 mg ont été

prélevées. Ces sections ont été homogénéisées dans 1 mL de réactif de trizol puis incubés à température pièce pendant cinq minutes. Un volume de 200 μ L de chloroforme est ajouté à la lyse cellulaire puis la solution est incubée pendant 3 minutes. La solution est centrifugée à 12 000 x g pendant 15 minutes à 4°C afin de séparer la phase aqueuse contenant les ARN de la phase organique. La phase aqueuse est transférée dans une nouvelle série de tubes. Pour précipiter l'ARN, un volume de 500 μ L d'isopropanol froid est ajouté à la phase aqueuse. Après une incubation de 10 minutes, les tubes sont centrifugés à 12 000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé des tubes et ensuite les culots sont nettoyés en ajoutant 1 mL de solution d'éthanol 75%. Après une centrifugation de 5 minutes à 7 500 x g, le surnageant est éliminé. Les culots sont séchés sous hotte avant d'être suspendus dans 20 μ L d'eau stérile sans ARNase. La concentration de chaque échantillon a été mesurée en utilisant l'absorbance à 260 nm et la qualité des ARN a été vérifiée avec le ratio d'absorbance 260 nm / 280 nm, cependant aucune vérification de l'intégrité des échantillons n'a été effectuée.

Synthèse d'ADN complémentaire

La réaction de transcription inverse a été réalisée avec la trousse commerciale Omniscript RT (Quiagen, Canada) selon les instructions du fabricant en utilisant l'amorce Oligo dt12-18 (Invitrogen Life Sciences, USA) un appareil Biometra pendant 60 minutes à 37°C.

Réaction de PCR en temps réel

Le Power Master SYBR® Green Mix (Invitrogen Life Sciences, USA) a été utilisé pour les réactions PCR selon les instructions du fabricant. Des mélanges réactionnels séparés ont été préparés à une concentration de 225 nM pour les différentes paires d'amorces β -actine à 225nM. Trois microlitres de solution d'ADN complémentaire ont été ajoutés à 17 μ l du mélange réactionnel dans deux tubes de 0,1 mL (Corbett Research, Sydney, Australie) pour un volume final 20 μ l. Chaque réaction a été préparée en duplicata. La réaction de PCR a été réalisée dans un appareil Rotor Gene RG-3000 (Corbett Research, Sydney, Australie). Le programme de PCR a été configuré comme suit : une première prise à 95 ° C pendant 10

minutes. Chaque cycle consistait en 30 secondes à 95 ° C, 60 secondes à 57 ° C et 30 secondes à 72 ° C. Chaque expérimentation était constituée de 45 cycles. La β -actine a été utilisé comme gène de contrôle interne.

Tableau 5
Amorces utilisées

Amorces	Sens	Antisens
β -Actine	5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGG-3'	5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3'
ER- α	5'GGCAAATGATGAAACAGAAA-5'	5'-AGAAAGAAAAGTGTACACACC-3'
ER- β	5'-TATCGAATCCTGCGCCGCCATCGT-3'	5'-GCTTTCCAACAGCCTGACTTGGTC-3'
ERR γ	5'-CTCGCCACCTCTCTACCCTT-3'	5'-GCTTGTACTTCTGCCGACCTC-3'
GPR30	5'-AGTCGGATGTGAGGTTTCAAG-3'	5'-TCTGTGTGAGGAGTGCAAG-3'
CXCR4	5'-GAACTTCCTATGCAAGGCAGTCC-3'	5'-CCATGATGTGCTGAAACTGGAAC-3'
TNF- α	5'-GTGACAAGCCTGTAGCCCA-3'	5'-ACTCGGCAAAGTCGAGTAAG-3'

Les valeurs de ΔC_t déterminées par le logiciel Rotor Gene 6 ont été utilisées pour calculer le rapport d'expression relative ($R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$) d'un échantillon par rapport au témoin exprimées par rapport au gène de référence de β -actine.

Isolation et culture de cytotrophoblastes primaires.

Les cytotrophoblastes ont été isolés selon une méthode adaptée de Kliman *et al.*, (1986). Comme mentionné précédemment, un échantillon de 35 à 40 g de tissu villositaire placentaire est prélevé dans un délai ne dépassant pas 30 minutes suivant l'accouchement. L'excédent de sang est absorbé et le tissu est ensuite découpé en fines sections d'environ 0,5 cm³ à l'aide d'un scalpel. Ces sections sont ensuite rincées avec de la saline physiologique (saline 0,9%) à température pièce jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de sang.

Le tissu est ensuite digéré trois fois pendant 30 minutes dans une solution 0,15% trypsine de type III (Sigma Aldrich, Canada), 0,8 mM de MgSO₄, 0,1 mM de CaCl₂, 1% de solution d'antibiotique 100X (Wisent inc, Canada), 0,02% ADNase de type I (Roche Diagnostic GmbH, Canada) dans du HBSS (Wisent inc, Canada) contenant 25 mM HEPES (Sigma Aldrich, Canada) dans un bain d'eau à 37 ° C. Pour les deux dernières digestions, les fragments de tissu ont été sédimentés et le surnageant a été filtré à travers un tamis de nylon

ayant pores de 200 μ M. Dans un tube de 50 mL, un volume maximal 40 mL de suspension cellulaire est stratifié sur un volume de 5 mL de sérum foetal bovin (FBS). Les tubes sont ensuite centrifugés à 1000 x g pendant 10 minutes à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est remis en suspension dans 10 mL de DMEM à température ambiante. Au final, toutes les suspensions de cellules résultantes ont été regroupées, centrifugées à 1000 x g. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est remis en suspension dans un volume de 5 mL de DMEM. Les cellules cytotrophoblastes isolés des autres types cellulaires sur la base d'une stratification sur un gradient de densité discontinue de Percoll (PercollTM, GE Healthcare Life Science, USA) variant de 5% à 70%. Chaque couche du gradient a un volume de 3 mL et représente un saut de densité de 5%. Le tube contenant le gradient et les cellules est centrifugé à 400 x g à température ambiante pendant 20 minutes. Les bandes cellulaires entre 40% et 50% ont été recueillies et lavées deux fois avec 40 mL de DMEM afin d'éliminer toutes traces de solution de digestion et de Percoll.

Les cellules recueillies sont mises en culture dans du DMEM sans rouge de phénol contenant 10% de FBS, 1% de mélange d'antibiotique 100X (Wisent inc, Canada), 2 mM de glutamine et 44 mM de bicarbonate de sodium PH 7,2. Les cellules sont incubées dans un incubateur d'air humidifié à 5% de CO₂ / 95% à 37°C et mises en culture à une densité de 1×10^5 cellules par cm² dans des contenants à culture ventilés. Précédemment à la mise en culture, afin de faciliter l'adhérence des cellules et favoriser leurs viabilités, les contenants de culture ont été traités avec une solution de 2,5% de poly-L-lysine pendant 5 minutes et séchés pendant 2 heures. Vingt-quatre heures après la mise en culture, le milieu de culture est changé afin d'éliminer les cellules non viables ainsi que les débris cellulaires. Par la suite, le milieu est changé à toutes les quarante-huit heures.

Immunofluorescence du récepteur CXCR4 dans des cellules placentaires dans un modèle *in vitro*.

Les cellules placentaires ont été cultivées sur des lamelles de verre pendant une nuit et ont été fixées avec du para-formaldéhyde 4% préparé dans du PBS. Les cellules ont été

perméabilisées à température ambiante de 5 minutes avec une solution de 0,15% de Triton X-100 préparé dans du PBS. Par la suite, les lamelles sont incubées dans une solution de 10% de sérum de chèvre et de 1% de BSA préparée dans du PBS pendant 20 minutes. Les lamelles sont ensuite incubées pendant deux heures avec un anticorps CXCR4 anti-humain de souris monoclonale (3 ug / mL) (Cedarlane, Canada) dilué dans la même solution. Après lavage avec du PBS, les lamelles ont été incubées pendant une heure avec un anticorps secondaire anti-souris Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Canada) dilué dans une solution de 10% de sérum de chèvre et de 1% de BSA préparée dans du PBS. Les noyaux ont été identifiés par une coloration 4', 6'-diamidino-2-phénylindole pendant 15 minutes à température ambiante. Après le montage, les lamelles sont observées sous microscope (Olympus BX61) à l'aide d'un mode épifluorescent et des photomicrographies sont prises. Les expériences ont été faites cinq fois. Les photomicrographies de l'immuno-coloration du CXCR4 et de la coloration des noyaux ont été réalisées en utilisant un temps d'excitation standard. L'utilisation de l'excitation standard assure une comparaison équitable entre chaque échantillon et assure une évaluation valide de l'immuno-coloration du récepteur CXCR4. L'intensité d'immuno-coloration a été évaluée en utilisant une méthode semi-quantitative adaptée d'un protocole antérieur décrit par Kayisli *et. al.*, (2003). En bref, un score de 0 (pas de coloration), 1+ (faible), 2+ (modérée), 3+ (intense) a été attribué. Pour chaque lame, une valeur CSCORE (score cellulaire) a été calculée en additionnant les pourcentages de cellules colorées à chaque intensité multipliée par l'intensité pondérée de la coloration ($CSCORE = \sum P_i (i + 1)$, où i est le score d'intensité et P_i est le pourcentage correspondant des cellules). Deux observateurs aveugles aux données de traitement ont réalisé le CSCORE, et la variation interindividuelle était de 10%. Deux observateurs ont évalué l'intensité de coloration des cellules à l'aveugle, et la variation interindividuelle était de 10%.

Quantification de concentration sérique maternelle en CXCL12

Afin de quantifier la concentration sérique maternelle en CXCL12, la trousse commerciale «*humain CXCL12 / SDF-1 DuoSet*» (R&D System, USA) a été utilisée. La quantification du CXCL12 dans le sérum maternel a été réalisée en fonction des instructions fournies par

le fabricant. L'anticorps de capture, fournis dans la trousse commerciale, a été adsorbé dans les puits d'une plaque de 96 puits pour ELISA Nunc Maxisorp (Sigma Aldrich, Canada). La solution d'anticorps était préparée en diluant ce dernier à une concentration de 1 µg/mL dans du PBS 1X. Un volume de 100 µL était déposé dans chaque puits et incubé à 4°C pour une période de 16 heures. La solution d'anticorps était ensuite éliminée et les puits lavés trois fois avec 200 µL de PBS-Tween 20 à 0,05%. Les sites libres ont été bloqués en déposant 200 µL d'une solution de PBS-1% de BSA (Sigma Aldrich, Canada) pendant une heure trente. La solution était ensuite éliminée et les puits lavés trois fois avec 200 µL de PBS-Tween 20 à 0,05%.

L'échantillon sérique était dilué 1:1 dans la solution de blocage (PBS-1% de BSA). Les solutions étalons étaient aussi préparées dans cette solution. Un volume de 100 µL de solution étalon ou d'échantillon était déposé dans les puits en fonction d'un plan de chargement préétabli. La plaque était incubée pendant deux heures à température ambiante. Les étalons et les échantillons étaient ensuite éliminés et les puits lavés trois fois avec 200 µL de PBS-Tween 20 à 0,05%.

L'anticorps de détection, fourni dans la trousse commerciale, a été ajouté à la concentration de 0,4 pg/mL. La solution d'anticorps a été préparée en diluant l'anticorps dans un volume de PBS-1% de BSA. Un total de 100 µL de solution d'anticorps de capture a été déposé dans chaque puits. Une incubation supplémentaire de deux heures à température pièce s'en est suivie. La solution était ensuite éliminée et les puits lavés trois fois avec 200 µL de PBS-Tween 20 à 0,05%.

Un volume de 100 µL de streptavidine-HRP a été déposé dans chaque puits. Après une incubation de 20 minutes, la solution était ensuite éliminée et les puits lavés trois fois avec 200 µL de PBS-Tween 20 à 0,05%. Finalement, 100 µL d'une solution de TMB (Sigma Aldrich, Canada) ont été ajoutés et incubés pendant 20 minutes dans le noir. La réaction a été arrêtée par l'ajout d'acide sulfurique, comme solution d'arrêt, dans chaque puits. La densité optique a été mesurée avec un lecteur de spectrophotomètre à 450 nm. Les concentrations de CXCL12 étaient ensuite déterminées en fonction de la courbe standard.

Afin que les résultats soient acceptés, un coefficient de corrélation (R^2) supérieur à 0,985 était requis.

Évaluation du BPA placentaire

Les niveaux d'accumulation de BPA libre dans les placentas ont été mesurés au moyen d'une technique de chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) développée dans notre laboratoire lors de travaux précédents (Aris, 2014b).

Le BPA et le BPC (utilisés comme étalon interne) (1 mg / mL) ont été préparés dans de l'éthanol à 50% et conservés pendant un maximum de 3 mois à 4°C. Une solution à 5 µg/mL des composés précédents a été effectuée avant une extraction de BPA avec de l'éthanol à 10% et une solution supplémentaire de BPA à 0,5 µg/mL. Ces solutions ont été utilisées comme calibrateurs. Des échantillons d'étalonnage (0,2 mL) ont été préparés en ajoutant 20 µL de BPC (5 µg/mL), puis respectivement 20 µL, 4 µL de BPA (5 µg/mL), 20 µL, 4 µL de BPA solution à 0,5 µg/mL. Les échantillons d'étalonnage contiennent 100 ng d'étalon interne (500 ng/mL), 100 ng (500 ng/mL), 20 ng (100 ng/mL), 10 ng (50 ng/mL), 2 ng (10 ng/mL) 1 ng (5 ng/mL), 0,5 ng (2,5 ng/mL), 0,005 ng (0,025 ng/mL) de BPA.

Procédure d'extraction

Les blancs cliniques, les échantillons et la courbe d'étalonnage ont été extraits en utilisant une extraction liquide-liquide. Des volumes de 200 µL de solution à extraire ont été transférés dans des tubes en verre de 5 mL. Deux millilitres d'acétate d'éthyle ainsi qu'un volume 20 µL de BPC (5 µg/mL) ont été ajoutés aux tubes. Les tubes ont été scellés avec des capuchons revêtus de Teflon et agités pendant 30 minutes à température pièce sur un agitateur rotatif.

Après 30 minutes, les tubes sont centrifugés pendant deux minutes à 1000 x g et 1,5 mL de surnageant a été transféré dans une nouvelle série de tubes en verre de 5 mL. Les échantillons ont été évaporés à sec sous un jet d'azote. Les échantillons ont été reconstitués

dans 100 µL d'une solution 1 : 1 de N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide avec 1% de tert-Butyldimethylchlorosilane (Sigma Aldrich, Canada) et d'acétate d'éthyle (Sigma Aldrich, Canada). Les échantillons sont soumis au vortex pendant 30 secondes toutes les 5 minutes pendant 30 minutes. Les échantillons dérivés sont transférés dans des fioles à analyse en verre scellées et seront analysés par GC-MS (Agilent Technologies 6890N GC et 5973 Inert MS).

Analyse GC-MS

Pour les analyses chromatographiques, une colonne capillaire de silice fondue Zebron ZB-5MS de 30 mm x 0,25 mm avec une épaisseur de film de 0,25 µm de Phenomenex (Torrance, CA, USA) été utilisée. Comme gaz porteur, de l'hélium a été injecté au rythme de 1,1 millilitre par minute. Un volume de 2 µL d'extrait a été injecté en mode fractionné à une température d'injection de 250°C. La température du four a été programmée pour augmenter de 5°C par minute d'une température initiale de 100°C (maintenue pendant 3 minutes) à 300°C (maintenue pendant 5 min). Les températures du quadrupole, de la source d'ions et de l'interface du détecteur de masse sélective étaient respectivement de 150°C, 230°C et 280°C. Le spectromètre de masse a été utilisé dans le mode de surveillance des ions sélectionnés (SIM). Les ions suivants ont été surveillés (avec des ions quantitatifs entre parenthèses) : BPA (441,0) 456,0; BPC (469,0) 484,0. La limite de quantification (LOQ) était de 0,10 ng/mL, alors que la limite de détection (LOD) était de 0,01 ng/mL après détermination comme la concentration la plus faible donnant une réponse trois fois le bruit de base moyen.

La présence ubiquitaire du BPA nécessite différentes mesures afin de prévenir une contamination des échantillons. La contamination croisée potentielle des échantillons avec le BPA par des facteurs externes (tubes, embouts de pipettes, trousse de collecte des échantillons, réactifs chimiques et le GC / MS lui-même) a été évaluée avec des expériences de contrôle supplémentaires. L'expérience a été conduite en recueillant de l'eau distillée dans des tubes stériles de sérum de verre de 10 mL de BD Vacutainer (Franklin Lakes, NJ, USA) via des aiguilles Vacutainer stériles de 21 g de G au lieu du sang humain.

Ensuite, la procédure d'extraction et l'analyse GC/MS ont été effectuées en suivant les mêmes procédures que les échantillons de sérum humain.

Les échantillons standard ont été injectés avant et après l'analyse d'une série d'échantillons. L'échantillon standard de 0 ng/mL injecté à la fin de chaque série d'échantillons indiquait qu'il n'y avait pas de transfert entre deux échantillons. Les autres échantillons standard injectés à la fin de chaque série d'échantillonnage ont indiqué qu'il n'y avait pas de dégradation dans le temps du BPA pendant l'analyse GC / MS. Les taux de BPA dans les échantillons ont été calculés sur la base du rapport de l'aire sous la courbe de l'échantillon de BPA et du standard interne. La pente de la courbe (rapport de surface de crête par rapport à la quantité de BPA ajoutée) indique une dépendance linéaire ($r = 1.000$). Toutes les quantifications du BPA étaient basées sur une seule mesure.

Exposition des cellules placentaires primaire au Bisphénol A

Dans le cadre de l'évaluation de l'impact du Bisphénol A sur l'expression des récepteurs de l'œstrogène $ER\alpha$, $ER\beta$, $ERR\gamma$, $GPER$ et $CXCR4$, 1×10^6 cellules sont mises en culture dans une plaque de six puits traitée à la poly-L-lysine. Les cellules sont incubées 24 heures à 37°C afin de les laisser adhérer. Par la suite, le milieu de culture est remplacé par un milieu de culture sans rouge de phénol rouge contenant 10 ng/mL de BPA. Les cellules sont ensuite incubées pendant 24 heures à 37°C , 80% humidité et 5% CO_2 .

Dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité d'un anticorps dirigé contre le BPA à diminuer les effets de ce dernier, 3×10^4 cellules sont mises en culture dans une plaque quatre-vingt-seize puits traitée à la poly-L-lysine. Les cellules sont incubées 24 heures à 37°C afin de les laisser adhérer. Par la suite, le milieu de culture est remplacé par un milieu de culture sans rouge de phénol contenant 10 ng/mL de BPA. Les cellules sont ensuite incubées pendant 24 heures à 37°C , 80% humidité et 5% CO_2 ($\approx 17\%$ oxygène).

Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire suite à l'exposition au Bisphénol A a été mesurée sur la base d'un essai au sel de tétrazolium MTT. Des cytotrophoblastes isolés à partir de placenta provenant de grossesses sans complication ont été déposés au nombre 30 000 dans des puits d'une plaque 96 puits dans un volume total de 100 µL de milieu de culture complet. Après avoir été incubé pendant 24 heures, 10 µL d'une solution de 5 mg/mL de sel de tétrazolium (Sigma Aldrich, Canada) préparée dans du PBS 1X (Wisent inc, Canada) ont été ajoutés dans chaque puits. Les cellules sont remises à incuber pour 4 heures. Après l'incubation, le milieu de culture est éliminé entièrement à l'aide d'une micropipette en prenant soins de ne pas décoller les cellules des puits. Les membranes cellulaires sont ensuite solubilisées avec 100 µL d'une solution d'isopropanol – HCl 0,4 N et le formazan formé et accumulé dans les mitochondries est dissous. Une mesure de l'absorption est faite à 570 nm avec une référence à 680 nm. La viabilité relative est calculée en fonction de la viabilité d'un contrôle cellulaire non exposé au BPA. Cette méthode a été utilisée pour évaluer la viabilité des cytotrophoblastes exposés aux BPA, des cytotrophoblastes transfectés (voir section suivante) ainsi que pour évaluer l'effet d'un anticorps dirigé contre le TNF- α (Inflixamab™, Merck & Co, USA) à 100 ng/mL et l'anticorps dirigé contre le BPA (Acris, USA).

Transfection

Les petits ARN interférents (siRNA) contre l'ARNm ERR γ ont été achetés auprès de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, USA). Pour l'expérience, les trophoblastes ont été récoltées avec une solution de trypsine (Wisent Bioproducts INC, Canada) selon la direction du fabricant. Les cellules ont ensuite été transfectées avec des siRNA en utilisant un réactif de transfection Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies, États-Unis) selon les instructions du fabricant. Pour confirmer les résultats expérimentaux, l'ARN total a été extrait et une PCR en temps réel a été conduite pour assurer l'absence d'ARNm ERR γ détectable.

Migration cellulaire

Le test de migration des cellules placentaires a été effectué avec une trousse commerciale de migration cellulaire (EMD Biosciences, San Diego, États-Unis) dans des plaques à 96 puits, en utilisant des inserts contenant une membrane à pores de 8 μ de diamètre. Dans les chambres supérieures, 3×10^4 trophoblastes ont été mises en culture avec ou sans BPA et avec ou sans AMD3100 (Sigma Aldrich, Canada). Les chambres inférieures contenaient un milieu de culture supplémenté avec 100 ng / mL de CXCL12. Après 4 heures d'incubation à 37 ° C, les cellules qui ont été transférées dans les chambres inférieures vers le bas du filtre ont été délogées avec 200 μ l d'une solution de détachement dans un incubateur à 37 ° C pendant 30 minutes. Les cellules ont finalement été marquées avec de la calcéine et la fluorescence a été mesurée avec un lecteur de plaque de fluorescence selon un spectre d'émission d'excitation de 485/520 nm. Le potentiel de polarisation est calculé en fonction d'un contrôle cellulaire non exposé au BPA ni à l'AMD3100 (Sigma Aldrich, Canada).

Analyse statistique

L'analyse statistique variera en fonction des différents types de mesures effectuées, soit la différence entre les moyennes, le test T de Student, le test de Mann-Whitney, lorsque approprié. L'erreur alpha acceptée sera inférieure à 0,05, pour établir une différence statistiquement significative.

RÉSULTATS

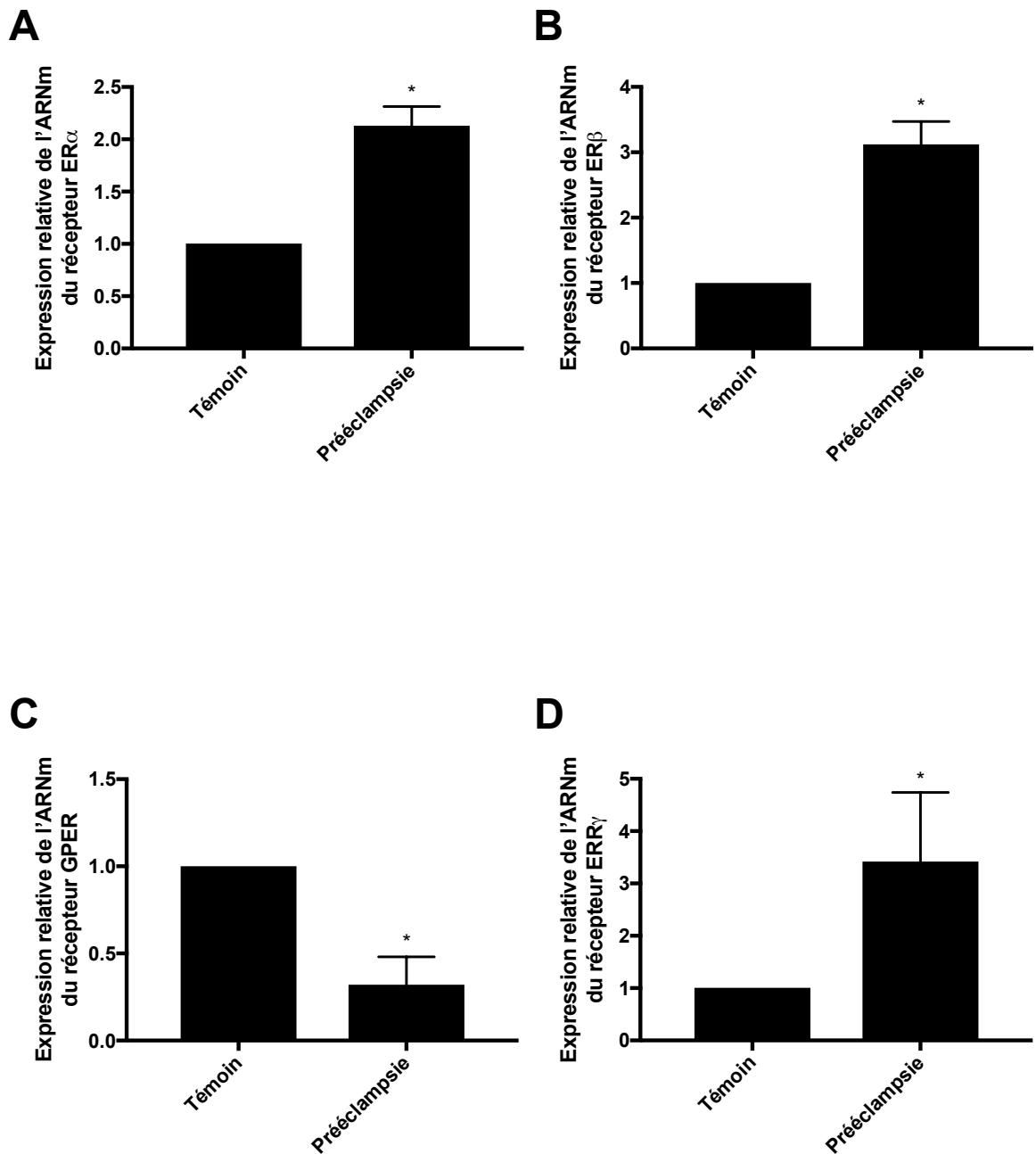
Objectif 1

Le premier objectif de cette étude était d'identifier les niveaux d'expression de récepteurs trophoblastiques de l'œstrogène ($ER\alpha$, $ER\beta$, $ERR\gamma$ & $GPER$) lors de grossesses normales ($n=20$) et compliquées par la prééclampsie ($n=20$) chez des femmes de la région de l'Estrie. Afin de mesurer les niveaux d'expression placentaire des récepteurs de l'œstrogène, une méthode de PCR en temps réel a été utilisée.

Lors de la mesure de l'expression du récepteur alpha de l'œstrogène, une augmentation significative de l'expression est observée (Figure 9A). Le récepteur $ER\alpha$ est exprimé $2,130 \pm 0,1838$ fois plus chez les femmes atteintes dont la grossesse est compliquée par la prééclampsie en comparaison aux femmes ayant une grossesse normale.

Figure 9

Expression relative des récepteurs des œstrogènes.



A) Expression relative du récepteur ER α dans des biopsies placentaires à terme de femmes dont la grossesse fut compliquée par la (Prééclampsie, n=20) ou non (Témoin, n=20). B) Expression relative du récepteur ER β dans des biopsies placentaires à terme de femmes dont la grossesse fut compliquée par la (Prééclampsie) ou non (Témoin). C) Expression relative du récepteur GPER dans des biopsies placentaires à terme de femmes dont la

grossesse fut compliquée par la (Prééclampsie) ou non (Témoin). D) Expression relative du récepteur $ERR\gamma$ dans des biopsies placentaires à terme de femmes dont la grossesse fut compliquée par la (Prééclampsie) ou non (Témoin). L'expression a été mesurée par PCR en temps réel et l'expression relative a été calculée par la méthode du ratio relatif tel que décrit dans la section 2. Les résultats étaient considérés scientifiquement pertinent (*) lorsque $RQ < 0,5$ ou $RQ > 2$.

Le même scénario est observé lors de la mesure de l'expression du récepteur de l'œstrogène bêta dans les échantillons placentaires (Figure 9B). Lors de la mesure de l'expression du récepteur bêta de l'œstrogène, une augmentation scientifiquement pertinente de l'expression fut observée. Le récepteur $ER\beta$ est exprimé $3,12 \pm 0,35$ fois plus chez les femmes dont la grossesse est compliquée par la prééclampsie en comparaison aux femmes ayant une grossesse normale.

Lors de la mesure de l'expression du récepteur de l'œstrogène GPER, une différence scientifiquement pertinente de l'expression fut observée (Figure 9C). Contrairement aux récepteurs $ER\alpha$ et $ER\beta$, c'est plutôt une diminution de l'expression qui est observée. Le récepteur GPER est exprimé $0,320 \pm 0,16$ fois moins chez les femmes dont la grossesse est compliquée par la prééclampsie en comparaison aux femmes ayant eu une grossesse normale.

Le dernier récepteur de l'œstrogène à proprement dit dont l'expression fut mesurée dans le tissu placentaire est le récepteur relatif à l'œstrogène gamma. À l'instar de l'expression des récepteurs $ER\alpha$ et $ER\beta$, une augmentation scientifiquement pertinente de l'expression du récepteur $ERR\gamma$ est observée (Figure 9D). Le récepteur $ERR\gamma$ est exprimé $3,42 \pm 1,32$ fois plus chez les femmes dont la grossesse est compliquée par la prééclampsie en comparaison aux femmes ayant eu une grossesse normale.

Objectif 2

Le deuxième objectif de cette étude était d'identifier les niveaux d'expression du récepteur

CXCR4 placentaire, un récepteur dont l'expression est tributaire de l'œstrogène, ainsi que les niveaux sériques d'un de ses ligands, le CXCL12, lors de grossesses normales (n=20) ou compliquées par la prééclampsie (n=20) chez des femmes de la région de l'Estrie. Afin de mesurer ces niveaux d'expression d'ARNm placentaire du récepteur CXCR4, une méthode de PCR en temps réel a été utilisée. Pour mesure l'expression protéique du récepteur CXCR4, une évaluation du score d'intensité de la fluorescence a été fait sur des immunofluorescences du récepteur dans des cellules trophoblastiques. Afin de déterminer les concentrations du ligand CXCL12, une quantification par ELISA a été faite au niveau du sérum maternel.

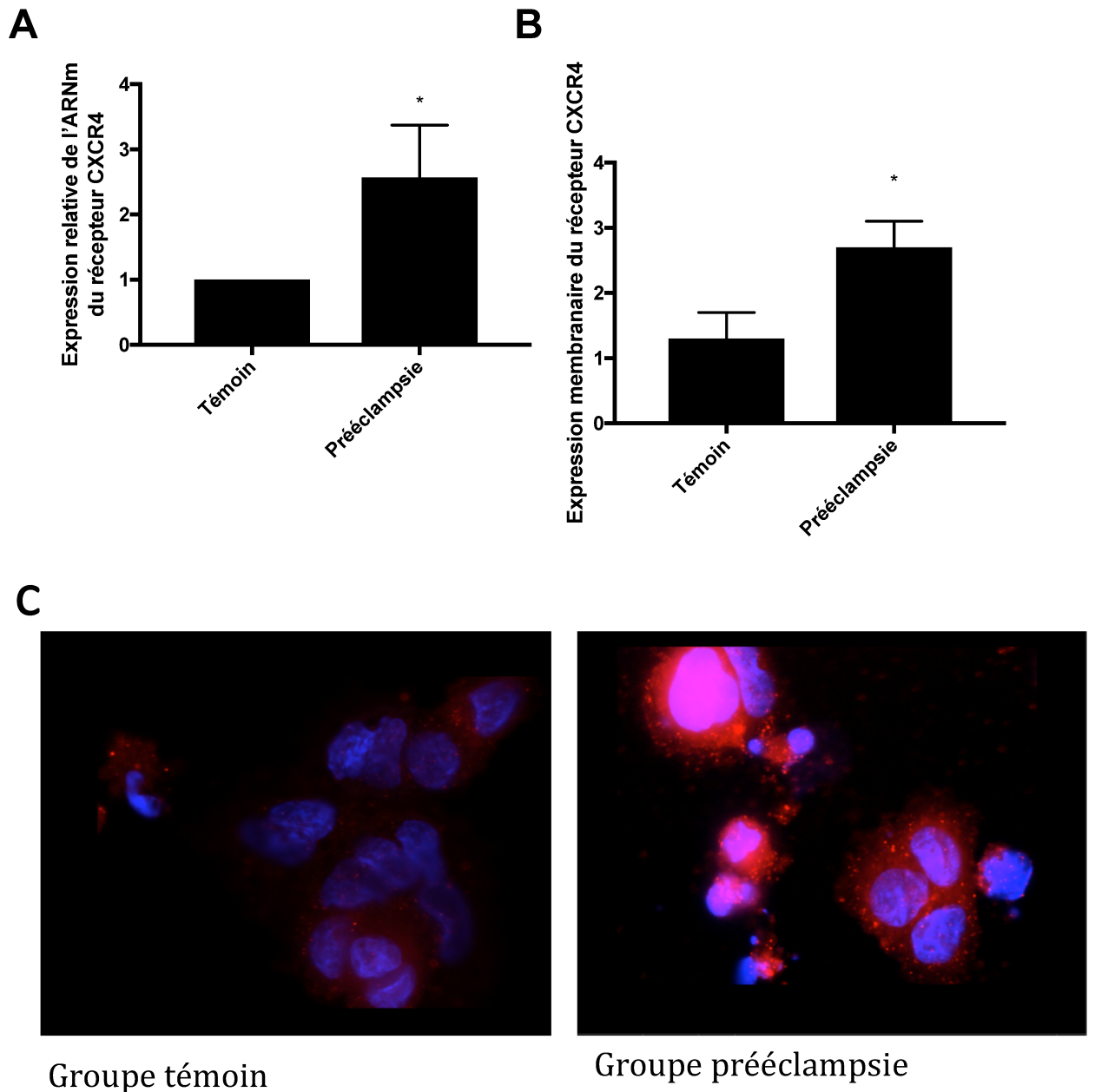
Quantification de l'expression du récepteur CXCR4 au niveau placentaire

L'expression du récepteur de chimiokine CXCR4 a aussi été mesurée dans les biopsies placentaires de femmes ayant eu une grossesse compliquée par la prééclampsie et des femmes ayant eu une grossesse normale (Figure 10A). Le récepteur CXCR4 est exprimé $2,57 \pm 0,78$ fois plus chez les femmes dont la grossesse est compliquée par la prééclampsie (n=20) en comparaison aux femmes ayant eu une grossesse normale.

Afin de confirmer l'augmentation d'expression du récepteur CXCR4 observée dans les biopsies, des cellules trophoblastiques provenant de placentas issus de grossesses compliquées par la prééclampsie et de grossesses normales ont été isolées et mises en culture sur des lamelles afin de faire une immunofluorescence (Figure 10C). Cette méthode a été favorisée à l'immunofluorescence sur tissus pour des raisons de coût et de disponibilité des équipements. Un niveau d'expression protéique du récepteur CXCR4 significativement élevée dans les cellules issues de placenta de grossesses compliquées par la prééclampsie ($2,8 \pm 0,4$) en comparaison aux cellules issues de placenta de grossesses normales ($1,2 \pm 0,4$, $P = 0,0003$).

Figure 10

Expression relative et membranaire du récepteur CXCR4.



A) L'expression relative du récepteur CXCR4 dans des biopsies placentaires à terme de femmes dont la grossesse fut compliquée par la prééclampsie (Prééclampsie, n=20) ou non (Témoin, n=20) a été mesurée par PCR en temps réel et l'expression relative a été calculée par la méthode du ratio relatif tel que décrit dans la section 2. Les résultats étaient considérés significatifs (*) lorsque $RQ < 0,5$ ou $RQ > 2$. B) L'expression membranaire du

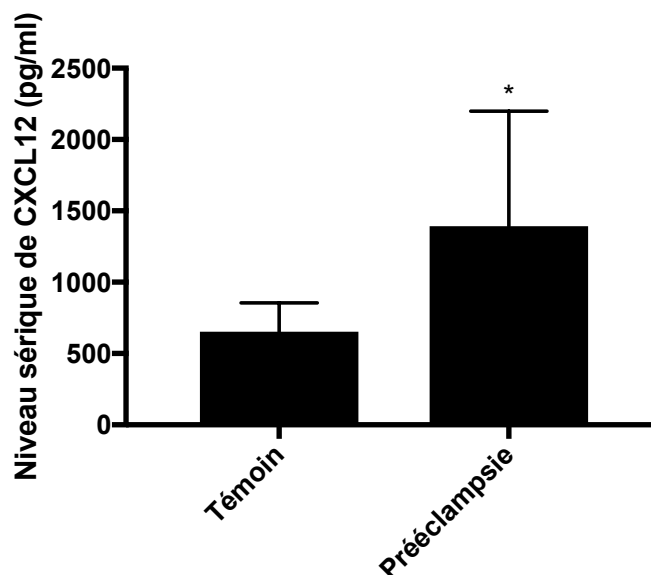
récepteur CXCR4 dans des cellules placentaires isolées de placenta à terme de femmes dont la grossesse fut compliquée par la prééclampsie (Prééclampsie, n=5) ou non (Témoin, n=5). L'expression a été mesurée par IHF et la quantification a été faite telle que décrit dans la section 2 et significatif (*) à $P < 0,05$. C) Immunofluorescence typique du récepteur CXCR4 sur des cellules placentaires normales versus des cellules placentaires issues de grossesses compliquées par la prééclampsie.

Quantification sérique maternelle du CXCL12

La concentration de CXCL12 dans le sérum de femmes dont la grossesse a été compliquée ou non par la prééclampsie a été déterminé par une méthode de type ELISA. Une augmentation significative de la concentration sanguine en CXCL12 est observée chez les femmes dont la grossesse est compliquée par la prééclampsie en comparaison aux femmes dont la grossesse fut normale (Figure 11). Une concentration de 1396 ± 805 pg/mL est retrouvée dans le groupe prééclampsie alors qu'une concentration de 653 ± 202 pg/mL est retrouvée dans le groupe contrôle (Figure 11). Cette augmentation significative représente une augmentation de 213,78% ($P = 0,028$; *test T de Student*).

Figure 11

Concentrations sérique maternelles de CXCL12.



Les niveaux de CXCL12 ont été évalués à l'aide d'une méthode ELISA dans le sérum de femmes dont la grossesse fut compliquée par la prééclampsie (Prééclampsie) et ou non (Témoin), $P = 0,028$, $*=P<0,05$. La comparaison entre les groupes de contrôle et pré-éclamptique a été effectuée avec le test de Mann-Whitney.

Objectif 3

Le troisième objectif de cette étude était de déterminer la concentration en Bisphénol A dans les échantillons placentaires chez des femmes dont la grossesse fut compliquée par la prééclampsie ($n=20$) ou non ($n=20$). Les mesures ont été effectuées via une méthode de chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse.

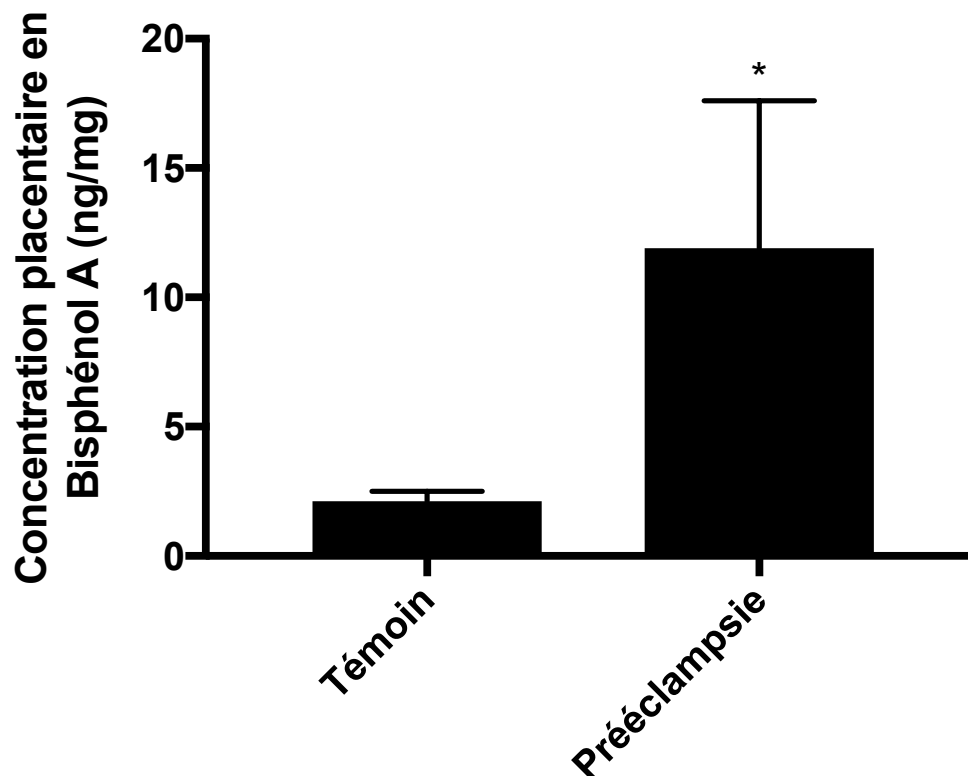
Une des plus grandes difficultés avec la quantification du Bisphénol A est la possibilité d'une contamination croisée des échantillons par du Bisphénol A par des facteurs externes (tubes, embouts de pipettes, trousse de collection sanguine, réactifs chimiques et le GC / MS lui-même). Cette possibilité a été évaluée avec des expériences de contrôle supplémentaires. Les résultats de ces expériences ont démontré qu'il n'y avait pas de Bisphénol A ou que les quantités potentiellement présentes sont en-dessous de la limite de

détection. Il n'y avait aucune preuve de contamination des échantillons par le Bisphénol A par la lixiviation du Bisphénol A à partir des matériaux utilisés pendant le cycle de l'expérience. En outre, une expérimentation supplémentaire démontre qu'il n'y a pas eu d'effet de transport entre deux échantillons et qu'il n'y a pas eu de dégradation dans le temps du Bisphénol A pendant l'analyse GC / MS.

Après avoir établi qu'il n'y a pas de contamination croisée par un facteur externe et qu'il n'y a pas de dégradation du BPA dans le temps, les niveaux de bisphénol A dans les biopsies placentaires ont été mesurés. Une accumulation significativement plus élevée a été mesurée dans le groupe Prééclampsie (Figure 12). L'accumulation pour le groupe Témoin et le groupe Prééclampsie était respectivement de $2,3 \pm 0,37$ ng/g et $11,9 \pm 5,13$ ng/g ($P=0,0038$, test de Mann-Whitney).

Figure 12

Concentrations placentaires de Bisphénol A



Les concentrations placentaires de Bisphénol A ont été mesurées à l'aide d'une méthode chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse dans le placenta de femmes dont la grossesse fut compliquée par la prééclampsie (Prééclampsie, n=20) ou non (Témoins n=20). Les concentrations de Bisphénol A ont été exprimées en ng/mg : moyenne \pm ET. La comparaison entre le groupe Témoin et le groupe Prééclampsie a été effectuée avec le test de Mann-Whitney. Les résultats étaient significatifs à $*=P<0,05$.

Objectif 4

Le quatrième objectif de cette étude était de mesurer l'effet du BPA sur l'expression des récepteurs de l'œstrogène et du récepteur CXCR4. Des cellules cytotrophoblastiques ont été isolées de grossesses sans complication et ont été exposées à une concentration de 10 ng/mL de Bisphénol A pour une période de 24 heures. Suite à cette exposition, afin de

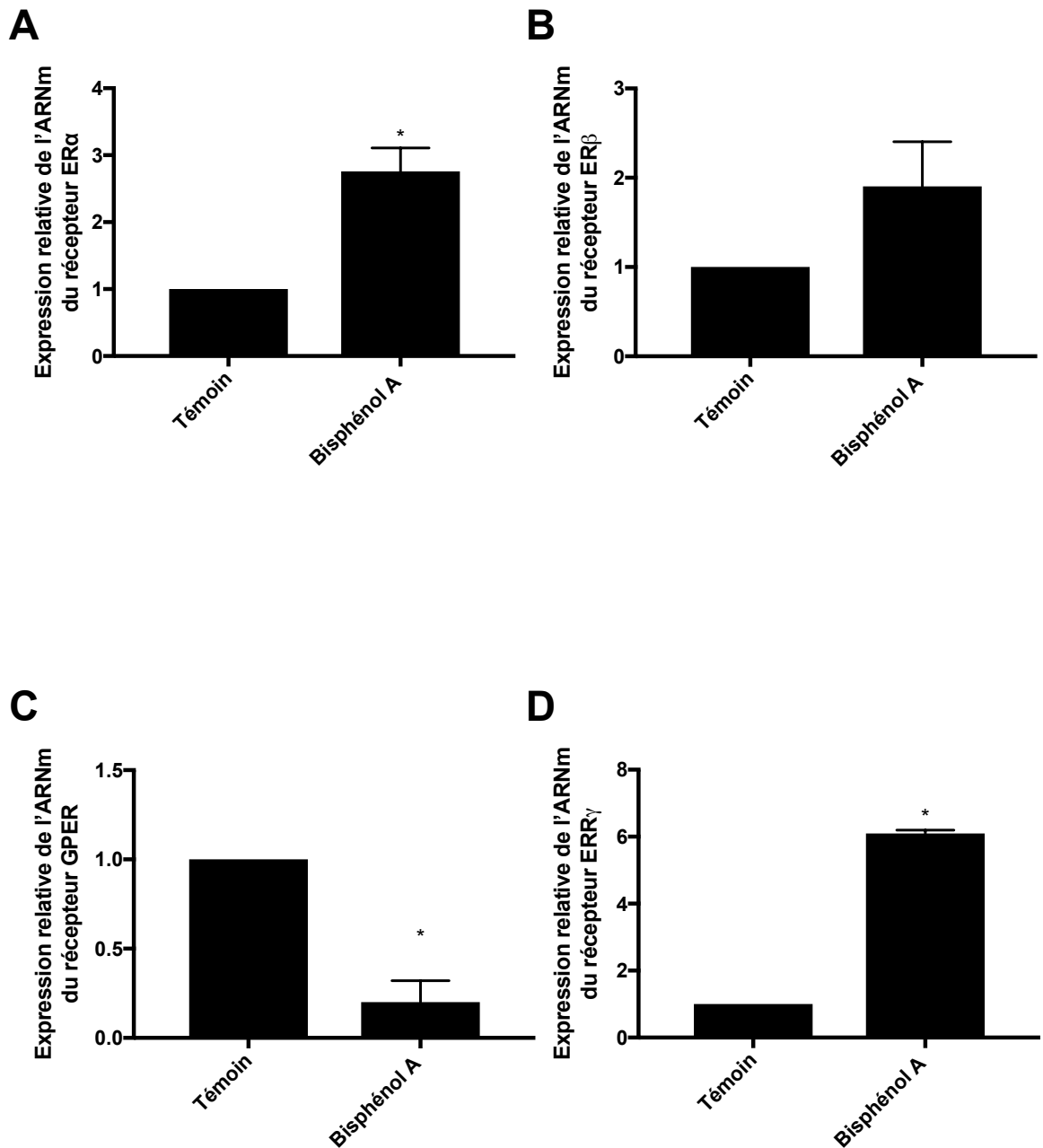
mesurer les modifications des niveaux d'expression placentaire, la méthode de PCR en temps réel employé à l'objectif 1 a été utilisée afin d'évaluer l'effet de l'exposition au BPA sur l'expression des récepteurs de l'œstrogène à l'étude ainsi que du récepteur CXCR4. Nos résultats ont montré que le Bisphénol A, en tant que xénoœstrogène, a la capacité de modifier l'expression des récepteurs des œstrogènes.

Modification de l'expression des récepteurs de l'œstrogène par le BPA

Lors de la mesure de l'expression du récepteur alpha de l'œstrogène, une augmentation scientifiquement pertinente de l'expression est observée. Le récepteur ER α est exprimé $2,76 \pm 0,35$ fois plus dans les cellules exposées pendant 24 heures à 10 ng/mL de Bisphénol A en comparaison aux cellules dites contrôles non-exposées au Bisphénol A.

Figure 13

Expression relative des récepteurs des œstrogènes dans ces cellules placentaires exposées au Bisphénol A



A) Expression relative du récepteur ERα dans des cellules placentaires normales exposées au Bisphénol A. (N=5) B) Expression relative du récepteur ERβ dans des cellules placentaires normales exposées au Bisphénol A. (N=5) C) Expression relative du récepteur

GPER dans des cellules placentaires normales exposées au Bisphénol A. (N=5) D) Expression relative du récepteur ERR γ dans des cellules placentaires normales exposées au Bisphénol A (N=5). Des cellules placentaires isolées à partir de placentas normaux à terme ont été exposées à 10 ng/mL de Bisphénol A sur une période de 24 heures. L'expression a été mesurée par PCR en temps réel et l'expression relative a été calculée par la méthode du ratio relatif tel que décrit dans la section 2 où les résultats sont considérés scientifiquement pertinent (*) lorsque $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$.

En ce qui concerne la mesure de l'expression du récepteur de l'œstrogène bêta dans les échantillons placentaires, aucune différence pertinente ne fut observée (Figure 13B). Le récepteur ER β est exprimé $1,90 \pm 0,50$ dans les cellules exposées pendant 24 heures à 10 ng/mL de Bisphénol A en comparaison aux cellules dites témoins qui sont non-exposées au Bisphénol A.

Contrairement au récepteur ER α où le Bisphénol A induit une augmentation de l'expression, lors de la mesure de l'expression du récepteur de l'œstrogène GPER, une diminution scientifiquement pertinente de l'expression fut observée (Figure 13C). Le récepteur GPER est exprimé $0,20 \pm 0,12$ par rapport au contrôle. Cela représente une expression 5 fois moins dans les cellules exposées pendant 24 heures à 10 ng/mL de Bisphénol A en comparaison aux cellules dites témoins qui sont non-exposées au Bisphénol A.

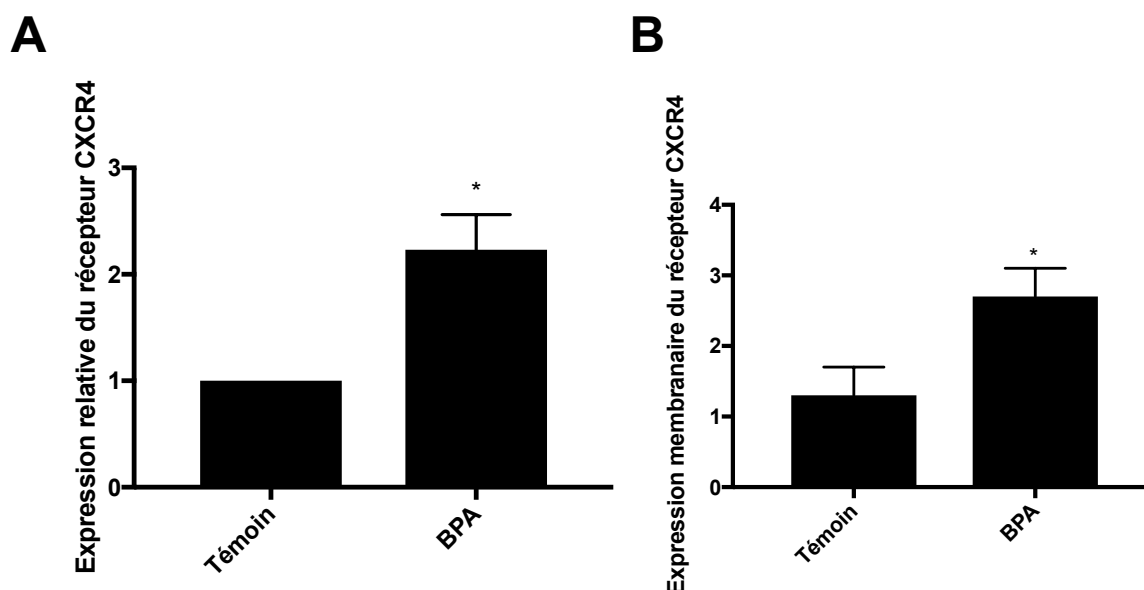
Le dernier récepteur de l'œstrogène à proprement dit dont l'expression fut mesurée grâce à ce modèle *in vitro* fut le récepteur ERR γ . À l'instar de l'expression du récepteur ER α , une augmentation scientifiquement pertinente de l'expression du récepteur ERR γ est observée (Figure 13D). Le récepteur ERR γ est exprimé $6,10 \pm 0,10$ dans les cellules exposées pendant 24 heures à 10 ng/mL de Bisphénol A en comparaison aux cellules dites témoins qui sont non-exposées au Bisphénol A.

Modification de l'expression du récepteur CXCR4 par le BPA

L'expression du récepteur de chimiokine CXCR4 a aussi été mesurée dans les cellules placentaires à l'aide de ce modèle. L'exposition au Bisphénol A entraîne une augmentation significative de l'expression du récepteur CXCR4 tant aux niveaux de l'ARNm que de la protéine. L'analyse par PCR en temps réel a démontré que le récepteur est exprimé $2,24 \pm 0,33$ plus dans des cellules exposées au Bisphénol A en comparaison à des cellules dites témoins qui n'ont pas été exposées au Bisphénol A (Figure 14A). Cette augmentation de l'expression observée au niveau de l'ARNm est aussi observable au niveau protéique (Figure 14B). Le score d'immunofluorescence a montré un score moyen de $2,7 \pm 0,4$ vs $1,3 \pm 0,4$ respectivement, $P=0,004$, pour les cellules trophoblastiques exposées ou non au Bisphénol A.

Figure 14

Expression relative de l'expression du récepteur CXCR4 et membranaire du récepteur CXCR4.



A) L'expression relative du récepteur CXCR4 dans des cellules placentaires isolées de placenta à terme de grossesses normales et exposées à 10 ng/mL de Bisphénol A pour 24 heures a été mesurée par PCR en temps réel et l'expression relative a été calculée par la

méthode du ratio relatif tel que décrit dans la section 2 où les résultats sont considérés scientifiquement pertinent (*) lorsque $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$. (N=5) B) L'expression membranaire du récepteur CXCR4 dans des cellules placentaires isolées de placenta à terme de grossesse normale et exposées à 10 ng/mL de Bisphénol A pour 24 heures. L'expression a été mesurée par immunofluorescences et la quantification a été faite telle que décrit dans la section 2 où la significativité (*) est établie à $P < 0,05$.

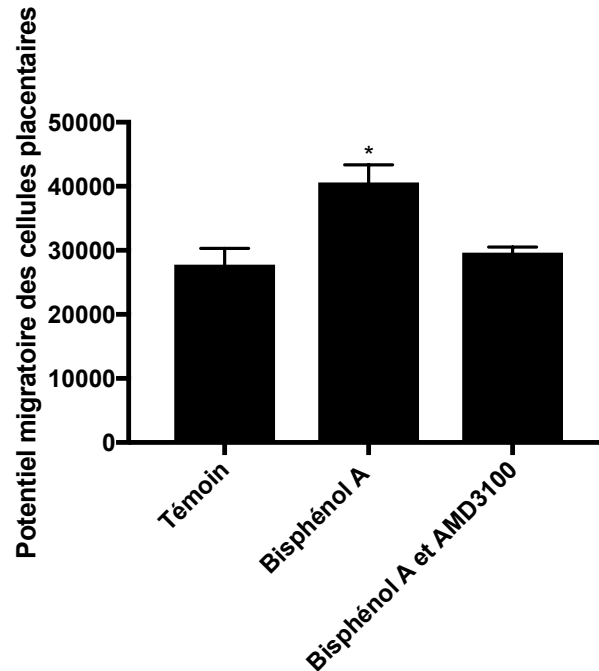
Objectif 5

Le cinquième objectif de cette étude était d'évaluer la modification du potentiel migratoire des cellules placentaires par le BPA. Pour ce faire un modèle d'exposition au BPA de cellules placentaires ainsi qu'une chambre Boyden ont été utilisés.

Les cellules placentaires exposées au BPA présentaient un potentiel migratoire plus élevé en comparaison avec des cellules témoins qui sont non-exposées (40590 ± 2778 vs. 27774 ± 2547 , $P < 0,0001$). L'addition d'un antagoniste sélectif du récepteur CXCR4, l'ADM3100, a pu prévenir la migration induite des cellules trophoblastiques par le BPA (29615 ± 858 vs 27774 ± 2547 , $P = 0,0004$; Figure 15).

Figure 15

Potentiel migratoire des cellules placentaires



Le potentiel migratoire des cellules placentaires isolées de placentas à terme de grossesse normale et exposées à 10 ng/mL de Bisphénol A pour 24 heures a été mesuré à l'aide d'une chambre de Boyden tel que décrit dans la section 2. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm ET. La comparaison entre les groupe témoins, le groupe Bisphénol A et le groupe Bisphénol A et AMD 3100 a été effectuée avec le test de Mann-Whitney. La valeur $P < 0,05$ (*) est considérée comme statistiquement significative.

Objectif 6

Le sixième objectif était de déterminer par quel mécanisme le BPA entraîne un effet sur la viabilité des cellules placentaires. Pour y arriver, une combinaison d'expérimentations *in vitro* sur un modèle placentaire d'exposition au BPA et de PCR en temps réel a été utilisée.

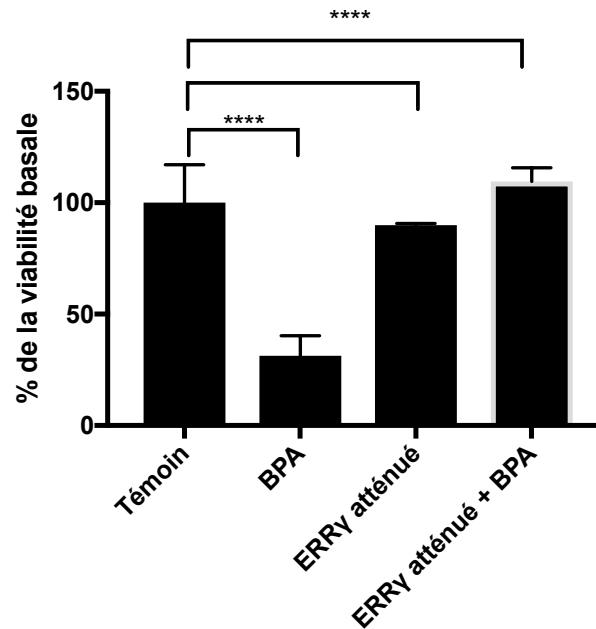
Afin de vérifier si la diminution de la viabilité cellulaire attribuée au BPA ($31,36\% \pm 8,90\%$ $P < 0,0001$) était associée à $ERR\gamma$, l'expression de ce dernier a été atténuée dans un

modèle de cellules trophoblastiques *in vitro*. Une fois l'atténuation de l'expression par petit ARN interférent confirmée, la première étape consistait à vérifier l'impact de cette modification sur la viabilité cellulaire (Figure 16). Cette modification n'a eu aucun effet significatif sur la viabilité cellulaire. En effet, les cellules dont l'expression du récepteur ERR γ est atténuée, ont proliféré à hauteur de $89,96\% \pm 0,7\%$ du niveau basal ($P > 0,9999$). Lorsque des cellules dont l'expression de ERR γ n'est pas atténuée sont exposées à 10 ng/mL de BPA pour une période de 24 heures, leur viabilité diminue de manière significative ($31,36\% \pm 8,90\%$ $P < 0,0001$). Lorsque l'on répète la même expérience avec des cellules dont l'expression du gène ERR γ est atténuée, la viabilité cellulaire n'est pas affectée de manière significative en comparaison avec des cellules contrôles. ($109,53\% \pm 6,10\%$, $P > 0,9999$).

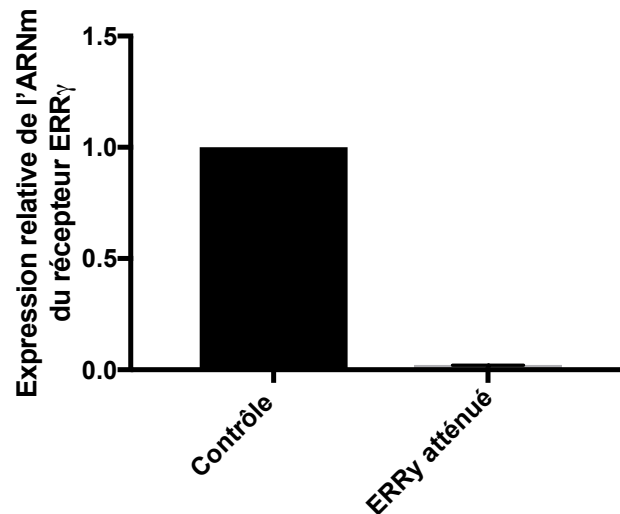
Figure 16

L'effet du BPA au travers du récepteur ERR γ

A



B

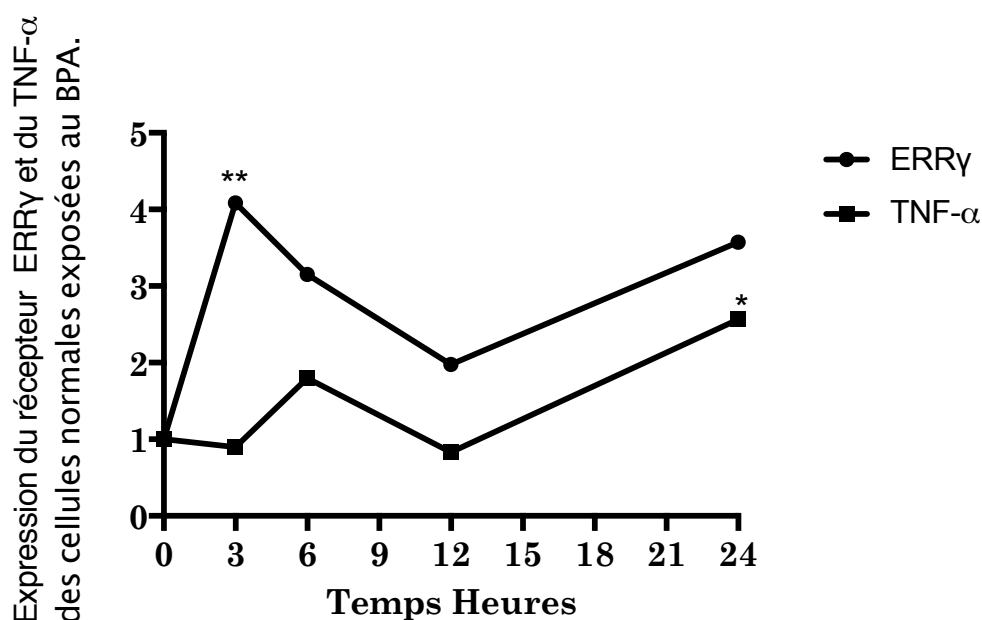


A) Viabilité cellulaires de cytotrophoblastes exposés au Bisphénol A. La viabilité cellulaire a été exprimée en pourcentage de viabilité basale (moyenne \pm ET) * : $P < 0,05$, **** : $P < 0,0001$. B) Confirmation de l'atténuation du récepteur ERR γ par PCR en temps réel.

Afin de déterminer si l'expression de l'effecteur de l'apoptose suspecté, le TNF- α , est augmentée significativement avant celle du récepteur ERR γ , des cellules placentaires ont été exposées à 10 ng/mL de BPA pendant une période de 0, 3, 6, 12 et 24 heures (Figure 17). Une augmentation significative de l'expression du récepteur ERR γ est observable 3 heures après le début de l'exposition. Dans le cas du TNF- α , l'augmentation significative n'est observable uniquement après 24 heures d'exposition.

Figure 17

L'effet de l'exposition au BPA sur l'expression du récepteur ERR γ et du TNF- α

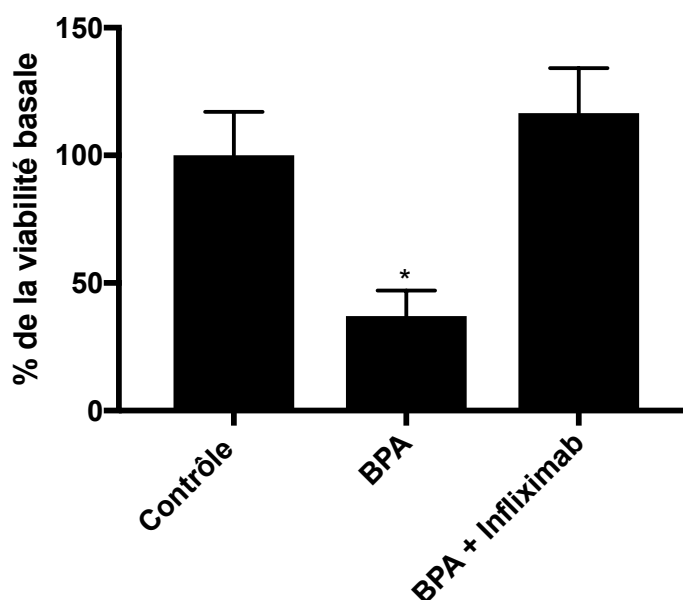


L'expression du récepteur ERR γ et du TNF- α dans des cellules placentaires isolées de placentas à termes normaux exposées à une concentration de BPA de 10 ng/mL pendant 24 heures a été mesurée par PCR en temps réel et l'expression relative a été calculée par la méthode du ratio relatif tel que décrit dans la section 2 où les résultats sont considérés scientifiquement pertinent (*) lorsque $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$. Les résultats sont considérés scientifiquement très pertinent (**) lorsque $RQ > 4$

Afin de confirmer si l'effet sur la viabilité cellulaire du BPA observé suite à son interaction avec le récepteur $ERR\gamma$ est bel et bien médié, *in vitro*, par la sécrétion de $TNF-\alpha$, des cellules placentaires ont été exposées à 10 ng/mL de BPA pendant une période de 24 heures et à un anticorps dirigé contre le $TNF-\alpha$ (Infliximab™) à 100 ng/mL (Figure 18). Chez ces cellules, le Bisphénol A n'avait aucun effet antiprolifératif en comparaison aux cellules non exposées au BPA ($116,53\% \pm 17,6\%$, $P = 0.2091$).

Figure 18

Viabilité cellulaire de cellules exposées au Bisphénol A



La viabilité cellulaire a été exprimée en pourcentage de viabilité basale (moyenne \pm ET),
 * : $P < 0,05$.

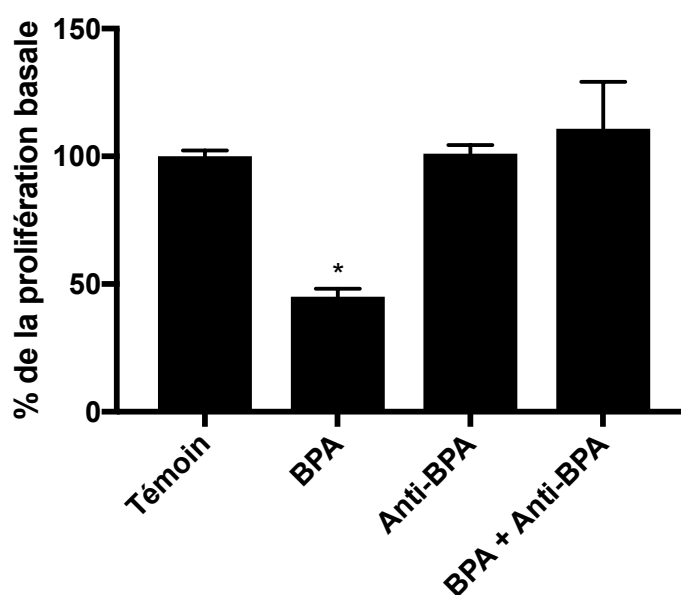
Objectif 7

Dans l'objectif précédent, il a été démontré qu'un anticorps dirigé contre le $TNF-\alpha$ a la capacité de diminuer l'effet antiprolifératif du BPA. Dans ce dernier objectif, le but était de déterminer la capacité d'un anticorps dirigé contre le BPA à contrer l'effet antiprolifératif de ce dernier sur les cellules placentaires. Pour y arriver, un modèle d'exposition des cellules placentaires au BPA ainsi qu'une méthode d'évaluation de la viabilité cellulaire ont été utilisés.

Afin de voir si un anticorps, dirigé contre le Bisphénol A, peut diminuer les effets toxiques de ce dernier sur les cellules placentaires trophoblastiques, des cytotrophoblastes ont été exposées à 10 ng/mL de Bisphénol A et à un anticorps anti-BPA à une concentration de 8 ng/mL (Figure 19). La première étape était de vérifier l'effet seul de l'anticorps sur les cellules. Il apparaît que l'anticorps n'a aucun effet significatif sur la viabilité cellulaire en comparaison avec les cellules non-exposées ($101,045 \pm 3,35\%$, $P=0,2459$). Lorsque les cellules sont exposées uniquement au Bisphénol A, une diminution de la viabilité est observée ($45,12 \pm 3,02\%$, $P=0,0079$). Lorsque des cellules sont exposées à la fois au BPA et à l'anticorps, aucune modification la viabilité n'a été observée en comparaison avec les cellules contrôles ($110,75 \pm 18,40\%$, $P=0,0952$).

Figure 19

Viabilité cellulaire de cellules exposées au Bisphénol A et à un anticorps dirigé contre le BPA



La viabilité cellulaire a été exprimée en pourcentage de viabilité basale (moyenne \pm ET) * : $P < 0,05$,

Discussion

L'hypothèse dans ce travail de recherche était que le BPA pourrait s'accumuler fortement dans le placenta ce qui aurait des effets sur l'expression des récepteurs ostrogéniques et le récepteur CXCR4 favorisant l'apparition de la prééclampsie. Cela aurait des effets sur l'expression des récepteurs ostrogéniques et le récepteur CXCR4, perturbant le développement cellulaire et l'angiogenèse placentaires, favorisant ainsi l'apparition de la prééclampsie. L'objectif général veut confirmer l'effet du BPA sur l'expression des récepteurs ostrogéniques et du récepteur CXCR4 au niveau placentaire d'abord par des spécimens *in situ* et ensuite *in vitro* sur des cellules placentaires. Sept objectifs ont été proposé afin de vérifier l'hypothèse

Le premier objectif de cette étude était d'identifier les niveaux d'expression des ARNm de récepteurs de l'œstrogène (ER α , ER β , ERR γ & GPER) dans des échantillons placentaires issus de grossesses normales et de grossesses compliquées par la prééclampsie chez des femmes de la région de l'Estrie. Une modification de l'expression de ces récepteurs pourrait avoir des conséquences physiologiques similaires à ce qui est observable, à un moment ou un autre, dans le développement de la pathologie de la prééclampsie. En exemple, une augmentation de l'expression du récepteur ERR γ pourrait entraîner une diminution de la viabilité des cellules placentaire et une augmentation du stress oxydatif, deux phénomènes observés dans la prééclampsie.

Dans cette étude, nous avons observé une augmentation significative de l'expression du récepteur ER α dans le tissu intervilloux placentaire chez des femmes dont la grossesse fut compliquée par la prééclampsie. Cette modification de l'expression du récepteur ER α concorde, avec les observations fait par Yin *et al.*, (2013). Ces derniers ont observé que l'expression du récepteur ER α est de 2,09 fois supérieure chez des femmes avec la prééclampsie (0.432 ± 0.067) en comparaison avec les femmes de leur groupe témoin (0.207 ± 0.044). Il est toutefois important de noter que leurs mesures ont été effectuées sur l'ensemble des tissus placentaires alors que dans ce travail, les efforts de mesures ont été

concentrés sur le tissu intervillositaire. Cela permettrait d'avoir le portrait de la modification de l'expression des ARNm du récepteur ER α là où se trouvent principalement des cellules trophoblastiques ; les cellules les plus sensibles à l'action de ce récepteur. De plus, par Yin *et al.*, (2013) se sont limités au recrutement de cas graves de prééclampsie alors que nous avons effectué nos mesures sur des placentas affectés par une forme légère ou modérée de la prééclampsie.

Selon par Yin *et al.*, (2013), l'origine de cette augmentation de l'expression de l'ARNm du récepteur ER α serait la conséquence d'une diminution de la concentration en œstrogène (Yin *et al.*, 2013). En effet, Yin *et al.*, (2013) ont mesuré une diminution de la concentration de l'œstradiol sérique chez des femmes dont la grossesse fut compliquée par la prééclampsie. Comme l'expression du récepteur ER α est, entre autre, régulée par une boucle de rétroaction négative (Swedenborg *et al.*, 2009), la diminution de la concentration en œstradiol, observée par par Yin *et al.*, (2013) pourrait être à l'origine de l'augmentation de l'expression du récepteur ER α dans le tissu placentaire dans les cas graves de prééclampsie.

Si cette explication tient la route dans le contexte où Ying et collaborateurs ont effectué leurs observations dans des cas graves de prééclampsie, cette explication ne permet pas d'expliquer les résultats obtenus dans cette étude. Il a été démontré que la diminution de la concentration sérique des œstrogènes est observable uniquement dans les cas de prééclampsie grave (Zeisler *et al.*, 2002). Dans les autres cas de prééclampsie, aucune différence significative au niveau de la concentration en œstrogène n'est observée entre les grossesses compliquées par la prééclampsie ou non (Zeisler *et al.*, 2002).

Dans cette étude, nous avons observé une augmentation de l'expression du récepteur ER α dans des échantillons couvrant les formes légères et modérées de la prééclampsie. La diminution de la concentration de l'œstrogène sérique ne peut expliquer l'augmentation de l'expression du récepteur ER α que nous avons observé. Une autre explication est que cette augmentation de l'expression pourrait venir d'une exposition plus élevée au Bisphénol A (Swedenborg *et al.*, 2009) comme il sera discuté plus loin.

Comme illustré dans la figure 20, l'augmentation de l'expression de ER α n'est pas sans conséquence dans le cadre de la grossesse. Cette augmentation pourrait affecter le développement et la maturation placentaire en étant entre autres responsable de la prolifération des cytotrophoblastes et de leurs syncytialisation (Bukovsky *et al.*, 2003). La prolifération et la maturation de ces cellules sont hautement contrôlées afin de produire un placenta fonctionnel. Il a été démontré que lors de la maturation du cytotrophoblaste en syncytiotrophoblaste, l'activation du ER α aurait la capacité d'induire la transcription du gène codant pour l'enzyme CYP19 (Kumar *et al.*, 2009). Une augmentation de ER α pourrait donc augmenter la sécrétion de CYP19, une enzyme jouant un rôle dans la production de des œstrogènes et donc modifier la production hormonale placentaire.

Une association a aussi été faite avec les récepteurs de l'œstrogène et l'expression du récepteur CXCR4. Une augmentation de l'expression et de l'activation des récepteurs de l'œstrogène (ER α et ER β) serait associée à celle de l'expression du CXCR4 (Kubarek et Jagodzinski, 2007). Par le fait même, cela pourrait augmenter la signalisation de l'axe CXCR4/CXCL12 et jouer un rôle dans le microchimérisme fœtal. Le rôle du microchimérisme fœtal sera discuté plus loin dans cette section.

Dans cette étude, nous avons aussi observé une augmentation de l'expression du récepteur bêta de l'œstrogène dans les biopsies placentaires de femmes dont la grossesse fut compliquée par la prééclampsie. Ces résultats sont concordant avec les travaux de Schiessl *et al.*, 2005 où ils avaient mesuré une augmentation de l'expression du récepteur ER β dans les cas de prééclampsie. Tout comme dans le cadre de l'étude de Yin *et al.* (2013), Schiessl *et al* (2005). ont effectué leurs mesures dans un échantillon complet de placenta.

Considérant une fois de plus qu'aucune différence significative au niveau de la concentration sérique en œstrogène n'est observée entre les grossesses compliquées par la prééclampsie et les grossesses normales, la thèse de la transcription induite par le ligand (Swedenborg *et al.*, 2009) ne peut être retenue. Il est maintenant connu que l'exposition à certains perturbateurs endocriniens tels que le Bisphénol A peut induire une modification

de l'expression du récepteur ER β (Swedenborg *et al.*, 2009). L'influence du BPA sur l'expression du récepteur ER β sera discutée plus loin dans cette section.

L'augmentation de l'expression du récepteur ER β observée chez les femmes atteintes de prééclampsie pourrait affecter la production hormonale placentaire (Schiessl *et al.*, 2005). Considérant le rôle du récepteur ER β dans le placenta, une modification de l'expression pourrait affecter la maturation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes. De plus, cette augmentation de l'expression pourrait entraîner la surproduction de molécules vasoconstrictrices via la voie des COX-2 et favoriser la vasoconstriction des artères spiralées ainsi que l'hypertension artérielle, deux phénomènes observés *in vivo* dans la prééclampsie. Finalement, l'augmentation de l'expression du récepteur ER β favoriserait l'augmentation de l'expression et de la sécrétion de VEGF, un autre phénomène observé *in vivo* dans la prééclampsie. En effet, la surexpression de VEGF et de sFlt1, son récepteur soluble, joue un rôle dans la déstabilisation de l'endothélium vasculaire observée dans la prééclampsie.

Une diminution de l'expression du récepteur GPER dans les biopsies placentaires a été observée dans le cadre de ce projet. Celle-ci est concordante avec des observations faites par un autre groupe de recherche. En effet, le groupe de Li *et al.*, (2016) collaborateurs ont observé une réduction de l'expression de la protéine GPER lors d'une étude par immunobuvardage. Ces résultats suggèrent donc une diminution à la fois de la transcription et de la traduction dans le cadre de la prééclampsie.

Même si aucune explication n'est encore disponible sur l'origine de cette diminution de l'expression dans les cellules placentaires dans le cadre de la prééclampsie, les conséquences sont bien connues. Au niveau placentaire, la diminution de l'expression joue un rôle dans la diminution la prolifération cellulaire et est associée avec l'augmentation de l'apoptose et de la nécrose des cellules placentaires (Li *et al.*, 2016). Ces deux phénomènes de mort cellulaire sont exhaustivement décrits dans la prééclampsie et sont considérés comme centraux dans le développement de la physiopathologie. On peut donc émettre

l'hypothèse qu'une diminution de la prolifération et de la viabilité des cytotrophoblastes en conséquence de la diminution de l'expression du récepteur GPER altère le processus de développement et le maintien du syncytiotrophoblaste, une structure majeure du placenta.

De plus, l'action de ce récepteur favorise la migration cellulaire, un phénomène essentiel dans l'invasion des cytotrophoblastes dans les artères spiralées à la 10^{ème} et à la 16^{ème} semaine. La diminution de l'expression de GPER pourrait donc être l'un des facteurs dans la diminution de l'invasion observée des cellules cytotrophoblastiques extravilleuses dans les artères spiralées. Cette diminution de l'invasion est aussi un phénomène exhaustivement décrit dans la prééclampsie et est même considéré comme un phénomène central dans la genèse de la prééclampsie (Lyall *et al.*, 2001 ; Myatt et Webster, 2009).

Pendant, le développement placentaire, un certain niveau de stress oxydatif est toujours présent. L'activation du récepteur GPER confère cependant une résistance aux cellules face au stress oxydatif en activant la transcription de Bcl-2 et de la cycline D (Kanda et Watanabe, 2003). La diminution de l'expression de GPER mesurée dans cette étude pourrait donc expliquer la mortalité des cellules placentaires dans le contexte du stress oxydatif particulièrement élevé qui est observé dans la prééclampsie.

Finalement, les cellules placentaires trophoblastiques à proximité des cellules vasculaires jouent un rôle dans la sécrétion de monoxyde d'azote via la régulation de la eNOs via l'expression et l'activation du récepteur GPER (Dimmeler *et al.*, 1999). Ainsi la diminution de GPER dans les cellules placentaires trophoblastiques joue un rôle dans la diminution de la sécrétion de NO observée dans la prééclampsie. Par défaut, une diminution de la sécrétion de NO favorise l'hypertension artérielle en modifiant le tonus vasculaire.

Le niveau d'expression placentaire du récepteur ERR γ fut mesuré à la fois chez les femmes atteintes de prééclampsie et chez des femmes ayant eu une grossesse normale. Une augmentation de l'expression de ce récepteur fut observée chez les femmes dont la grossesse était compliquée par la prééclampsie. Cette augmentation de l'expression est cohérente avec les résultats de Luo *et al.* (2014) dans la mesure où ils ont aussi observé une

augmentation de l'expression de ce récepteur dans les cas de prééclampsie.

Cette augmentation de l'expression, tout comme les autres modifications de l'expression des récepteurs de l'œstrogène, pourrait jouer un rôle important dans la pathologie de prééclampsie. Au niveau placentaire, une augmentation de l'expression de $ERR\gamma$ signifie une augmentation de l'expression de $KCNQ1$ et $KCNE1$, deux canaux ioniques exprimés dans le syncytiotrophoblaste où le transport d'ion et d'eau est nécessaire pour la synthèse ainsi que le relâchement d'hormones. L'expression de $ERR\gamma$ est associée à l'expression de $KLK1$, une protéine jouant un rôle dans l'agrégation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes. L'augmentation de l'expression du $ERR\gamma$ pourrait perturber la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste (Luo *et al.*, 2014). En d'autres termes l'augmentation de l'expression de $ERR\gamma$ altère la capacité de maturation du placenta et sa capacité à produire des hormones.

L'hypertension artérielle est l'une des composantes majeures de la prééclampsie étant même l'un des deux critères de diagnostic. L'augmentation de l'expression du récepteur $ERR\gamma$ pourrait jouer un rôle dans l'augmentation de la tension artérielle observée dans les cas de prééclampsie. Pour ce faire, l'activation du récepteur $ERR\gamma$ augmenterait la sécrétion de l'aldostérone via l'augmentation de la production de la 11- β -Hydrolase et de l'aldostérone synthase (Luo *et al.*, 2014). L'augmentation de la sécrétion de l'aldostérone résulte en une augmentation du niveau sodique sanguin, puis à une augmentation du volume sanguin et finalement une hypertension artérielle.

Au niveau cellulaire, l'augmentation de l'expression de $ERR\gamma$ perturberait le métabolisme énergétique des cellules placentaires et favoriserait une augmentation du stress oxydatif (Poidatz *et al.*, 2012). Une activité élevée du récepteur $ERR\gamma$ entraînent une modification de l'équilibre de métabolique au niveau mitochondriale et favoriserait la production d'espèces dérivées de l'oxygène (Deblois et Giguère, 2013). Ce mécanisme s'ajoute aux autres mécanismes connus dans la prééclampsie générant un stress oxydatif. Ce stress oxydatif induit une augmentation du $TNF-\alpha$, la sécrétion d'endothéline, de thromboxane, de $TGF-\beta$ ainsi que l'activation de la cascade des caspases.

Cette augmentation de l'expression du récepteur $ERR\gamma$ inhiberait la prolifération et de l'invasion des cytotrophoblastes (Luo *et al.*, 2014). Une inhibition de la prolifération cellulaire associée au récepteur $ERR\gamma$ est aussi observée dans le cas des cellules du cancer du sein (Tiraby *et al.*, 2011) ainsi que chez les cellules vasculaires. Le mécanisme d'action derrière l'inhibition de la prolifération cellulaire n'est pas encore bien connu. Il est possible que cela soit en lien avec l'augmentation de l'expression de $KCNQ1$, $KCNE1$ et $KLK1$ comme décrit précédemment. Cependant, le mécanisme d'action lié à l'augmentation de l'expression de ces gènes semble limité à la production hormonale ainsi qu'à la maturation du syncytiotrophoblaste. De plus, ce mécanisme n'est pas observé dans des cellules cancéreuses et dans les cellules vasculaires. Cela laisse croire à la présence d'un autre mécanisme possible.

Suivant la modification de l'expression des récepteurs de l'œstrogène, le deuxième objectif de cette étude était d'identifier les niveaux d'expression du récepteur CXCR4 placentaire, un récepteur dont l'expression est tributaire de l'œstrogène, ainsi que son ligand, le CXCL12, lors de grossesses normales et compliquées par la prééclampsie chez des femmes de la région de l'Estrie.

Selon nos observations, il apparaît que les niveaux d'expression du récepteur CXCR4 sont élevés chez les femmes dont la grossesse est compliquée par la prééclampsie. La modification de l'expression de l'axe CXCR4 dans le cadre de la prééclampsie ne fait cependant pas l'unanimité. L'équipe de Schanz *et al.*, (2011) n'ont observé aucune modification de l'expression du récepteur CXCR4 dans le placenta alors que l'équipe de Lu *et al.*, (2016) collaborateurs ont mesuré une diminution significative de l'expression du récepteur au niveau des cellules trophoblastiques dans les cas graves seulement de prééclampsie.

Différents facteurs peuvent expliquer l'augmentation de l'expression du récepteur CXCR4 dans le placenta de femmes atteintes par la prééclampsie. Dans un premier temps, le $TGF-\beta$ et VEGF qui sont bien connus pour être augmentés dans la prééclampsie (Keelan et

Mitchell, 2007; Chen *et al.*, 2010; Peraçoli *et al.*, 2008; Salvucci *et al.*, 2002) ont la capacité d'augmenter l'expression du récepteur CXCR4 (Busillo et Benovic, 2008). De plus, une association a aussi été faite entre les œstrogènes, leurs récepteurs et l'expression du récepteur CXCR4. Une augmentation de l'expression et de l'activation des récepteurs de l'œstrogène (ER α et ER β) est associée à une augmentation de l'expression du CXCR4 (Kubarek et Jagodzinski, 2007). L'augmentation de l'expression du récepteur ER α et l'augmentation de l'expression du récepteur ER β observées dans ces travaux de recherches pourraient donc jouer un rôle dans l'augmentation de l'expression du récepteur CXCR4. De plus, le Bisphénol A qui est fortement accumulé dans le placenta de femmes atteintes par la prééclampsie pourrait aussi jouer un rôle, en tant que xénoœstrogène, dans l'augmentation de l'expression du récepteur CXCR4 dans les cellules placentaires. Ce point sera discuté plus longuement plus loin dans cette section.

En parallèle à cette augmentation de l'expression du récepteur CXCR4, nous avons observé une augmentation de la sécrétion sérique maternelle du ligand CXCL12. Ces résultats concordent avec les résultats de Schanz *et al.*, (2011) qui ont eux aussi mesuré une augmentation de la concentration sérique de CXCL12 chez les femmes atteintes de prééclampsie en comparaison avec un groupe contrôle.

Même si ces résultats concordent, il est difficile d'expliquer le mécanisme exact derrière l'augmentation de la sécrétion de CXCL12 sérique chez les femmes atteintes de prééclampsie. Les œstrogènes pourraient réguler à la hausse la sécrétion de CXCL12 (Kubarek et Jagodzinski, 2007). Cependant, nous savons maintenant qu'il n'y a pas de différence dans les concentrations sériques en œstrogènes entre les grossesses compliquées par la prééclampsie et les grossesses non compliquées à l'exception des cas graves (Zeisler *et al.*, 2002). Il est donc peu probable que les œstrogènes soient responsables de ces observations. L'hypothèse que le Bisphénol A pourrait en tant que xénoœstrogène induire une augmentation de la production de CXCL12 a aussi été mise de l'avant. Cependant, tout comme dans le cas des œstrogènes, il n'y a aucune différence au niveau sérique entre les femmes dont la grossesse est compliquée par la prééclampsie en comparaison avec des

femmes ayant eu une grossesse normale (Leclerc *et al.*, 2014). Il est donc peu probable que le Bisphénol A soit derrière l'augmentation de la production de CXCL12.

Il est toutefois possible que cette augmentation résulte de la mobilisation des cellules immunitaires et régénératrices suivant les dommages vasculaires observés dans la prééclampsie (Schanz *et al.*, 2011). Il est aussi possible que les hauts niveaux de VEGF (Salvucci *et al.*, 2002) produits en réponse à l'hypoxie observée dans la prééclampsie (Keelan et Mitchell, 2007) en soit responsable. Il est maintenant connu que l'augmentation des niveaux de CXCL12 se produit seulement après la 20ème semaine (Schanz *et al.*, 2011) soit au même moment que l'apparition des manifestations cliniques de la prééclampsie, montrant des implications possibles entre le CXCL12 et la dysfonction endothéliale présente dans la maladie.

Mises ensemble, ces augmentations de l'expression du récepteur CXCR4 et de la chimiokine CXCL12 pourraient jouer un rôle dans le développement de la prééclampsie. L'augmentation de la production de CXCR4 dans la membrane des trophoblastes peut les propulser dans la circulation maternelle sous l'attraction du CXCL12. Dans la circulation, l'interaction récepteur CXCR4 avec le niveau élevé de CXCL12 active la voie ASK1/p38 MAPK suivant le recrutement de la β -arrestine 2 (Sun *et al.*, 2002) ou par l'activation de la voie Atk (Ray *et al.*, 2012). Les cellules placentaires maintenant en circulation peuvent exacerber la dysfonction observée dans la prééclampsie.

Afin de pouvoir vérifier si une accumulation placentaire du BPA pourrait être en lien avec ces modifications de l'expression du CXCR4/CXCL12 dans la prééclampsie, nous devons quantifier le BPA dans le placenta des femmes ayant une grossesse compliquée ou non par la prééclampsie. Le troisième objectif de cette étude était donc de déterminer les concentrations de Bisphénol A présente dans le placenta de femmes dont la grossesse fut compliquée ou non par la prééclampsie. Le BPA est connu pour ses effets de perturbateur du système endocrinien depuis les années 1930. C'est à cette époque que des premières études sur le Bisphénol A sont effectuées afin de déterminer le potentiel du BPA dans le contexte d'une thérapie de remplacement hormonale de l'œstrogène.

Aujourd'hui, le BPA est suspecté d'être impliqué dans différentes complications de grossesse. Dans l'étude actuelle, des concentrations de BPA ont été trouvées dans 100% des échantillons placentaires. Ces résultats sont concordants avec des études précédentes effectuées sur différents tissus humains (Schönfelder *et al.*, 2002, Ikezuki *et al.*, 2002, Jiménez-Díaz *et al.*, 2010, Cao *et al.*, 2012 et Yamada *et al.*, 2002). Ces résultats tendent à démontrer une exposition continue et une bioaccumulation de ce xénoestrogène.

Au cours de cette étude, une concentration supérieure en BPA fut retrouvée dans les échantillons placentaires provenant de femmes atteintes de la prééclampsie. Ces résultats sont cohérents avec les résultats d'une étude précédente où une concentration supérieure de BPA avait été trouvée dans le placenta à terme de femmes atteintes de prééclampsie (Leclerc *et al.*, 2014).

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées afin d'expliquer cette accumulation. Dans un premier temps, le BPA est une molécule lipophile. Un indice de masse corporelle (IMC) supérieur chez les femmes atteintes de prééclampsie pourrait expliquer une accumulation supérieure dans ce groupe de participantes. Cependant, aucune différence significative au niveau de l'IMC n'a été remarquée entre les deux groupes. Une différence d'IMC ne serait donc pas à l'origine de l'accumulation significative de BPA dans le placenta de femmes atteintes par la prééclampsie.

L'UDP-Glucuronosyltransférase (UGT) est une enzyme principalement retrouvée dans le foie et au niveau placentaire (Edlow *et al.*, 2012). La principale fonction est le transfert d'acide glucuronique sur les xénobiotiques afin de les rendre plus hydrosolubles dans le but de faciliter leur élimination dans l'urine (Völkel *et al.*, 2002). Une diminution de l'expression ou encore de l'activité de cette enzyme pourrait entraîner une augmentation de l'accumulation de BPA libre dans le tissu placentaire. Cela demeure cependant à prouver.

Dans le placenta, on retrouve aussi la β -glucuronidase, une enzyme catalysant exactement la réaction inverse (Edlow *et al.*, 2012). Une augmentation de l'expression ou de l'activité

de cette enzyme dans le placenta de femmes dont la grossesse est compliquée par la prééclampsie pourrait aussi expliquer l'augmentation de l'accumulation du BPA dans le placenta. Une aberration de l'expression de l'une ou de ces deux enzymes pourrait donc être responsable de l'accumulation supérieure de BPA dans le placenta des femmes atteintes de prééclampsie. Ces hypothèses demeurent cependant spéculatives, car aucune donnée sur la modification de l'expression ou de l'activité de ces enzymes dans les cellules trophoblastiques dans le cadre de la prééclampsie n'est pas disponible.

Au Canada, la réglementation est basée sur le fait que l'exposition actuelle au BPA ne pose pas de risque pour la santé. Une étude publiée en 2002 abondait aussi dans ce sens. Il y était stipulée que le Bisphénol A possède une très courte demi-vie de moins de six heures (5,3 heures) (Völkel *et al.*, 2002). Cette courte demi-vie laissait croire que le Bisphénol A ne pouvait s'accumuler significativement dans les différents tissus et qu'ainsi il ne pouvait pas avoir d'effet délétère sur la santé humaine.

L'accumulation du BPA dans tous les échantillons à l'étude tend aussi à démontrer que le temps de demi-vie du BPA serait plus important que ce qu'il fut avancé originalement par Völkel *et al.* (2002). Il apparaît maintenant que le Bisphénol A a la capacité de s'accumuler en faible quantité et que la courte demi-vie du BPA n'est donc pas un facteur de protection contre les effets perturbateurs du BPA comme cela était cru.

L'augmentation de l'accumulation du BPA dans le placenta de femme dont la grossesse est compliquée par la prééclampsie entraînait donc comme quatrième objectif de mesurer l'effet du Bisphénol A sur l'expression des récepteurs de l'œstrogène à l'étude et du récepteur CXCR4. Pour ce faire, des cytotrophoblastes ont été isolés à partir de placentas issus de grossesse à terme et sans complication. Ces cellules ont par la suite été exposées pendant 24 heures à 10 ng/mL de Bisphénol A. Finalement, la méthode de PCR en temps réel de l'objectif 1 a été utilisée pour déterminer l'impact du Bisphénol A sur l'expression des récepteurs en question.

Lors de ces expérimentations, une augmentation de l'expression du récepteur alpha de l'œstrogène est observée. Cette augmentation de l'expression concorde en partie avec les travaux fait par Schonfelder *et al.* (2004). Ces derniers ont déterminé que le Bisphénol A a la capacité d'augmenter l'expression du récepteur ER α dans le tissu utérin murin. Cette augmentation de l'expression du récepteur ER α observée *in vitro* est similaire à ce qui est observé *in vivo* dans les biopsies de placentas issus de grossesses compliquées par la prééclampsie. Il est alors possible d'émettre l'hypothèse que le Bisphénol A qui s'accumule en haute concentration pourrait être partiellement responsable de l'augmentation de l'expression du récepteur ER α .

Un scénario différent s'observe dans le cas du récepteur ER β . Suite à l'exposition des cellules placentaires au Bisphénol A, aucune modification significative de l'expression n'est observée. Il est donc impossible d'avancer que les modifications de l'expression du récepteur bêta de l'œstrogène observé *in vivo* sont causées par l'exposition au Bisphénol A.

Dans le cas du récepteur ER β , une limitation de la méthode doit cependant être prise en note. En effet, dans le cadre des expérimentations *in vitro*, des trophoblastes ont été utilisés comme modèle cellulaire. Ces cellules sont connues pour n'exprimer que très peu le récepteur ER β . L'expression de ER β est plutôt associée à la forme différenciée du trophoblaste, le syncytiotrophoblaste. Il devient donc difficile de statuer sur la pertinence du cette tendance à la hausse et de dire si le Bisphénol A est responsable de cette tendance à la hausse.

Comme dans le cas du récepteur ER α , l'exposition des cytotrophoblastes isolés à partir de grossesses sans complication au Bisphénol A induit les mêmes modifications de l'expression du récepteur GPER, soit une diminution de l'expression. Cette diminution de l'expression du récepteur GPER pourrait donc expliquer en partie la diminution de la prolifération et la diminution de la viabilité cellulaire observée lorsque de cellules placentaires sont exposées au Bipshénol A (Benachour et Aris, 2009). De plus, cette diminution de l'expression suite à l'exposition au Bisphénol A conforte l'hypothèse que le Bisphénol A induit des modifications de l'expression des récepteurs de l'œstrogène

pouvant ainsi avoir un rôle dans le développement et le maintien des symptômes de la prééclampsie.

Encore une fois, l'exposition des cytotrophoblastes isolés à partir de grossesses sans complication au Bisphénol A induit les mêmes modifications de l'expression du récepteur $ERR\gamma$ qui sont observées dans les biopsies, soit une augmentation de l'expression. Le Bisphénol A pourrait donc être partiellement responsable de l'augmentation de l'expression observée *in vivo* dans les biopsies. Cette augmentation de l'expression du récepteur $ERR\gamma$ par le Bisphénol A pourrait être responsable en partie du développement de la prééclampsie comme discuté précédemment, en plus d'être possiblement partiellement responsable de l'apoptose cellulaire comme il sera discuté ultérieurement.

Finalement, une augmentation de l'expression du récepteur CXCR4 est aussi observée lorsque les cellules placentaires sont exposées à une concentration en bisphénol A similaire à celle que l'on observe dans la prééclampsie. Cette augmentation de l'expression est similaire à celle que l'on observe *in vivo*. Cela démontre que le BPA pourrait jouer un rôle dans l'augmentation de l'expression du récepteur CXCR4 au même titre que l'œstrogène dans les cellules d'adénocarcinome endométrial d'Ishikawa (Kubarek et Jagodzinski, 2007) et ainsi jouer un rôle dans le microchimérisme fœtal et dans le développement de la prééclampsie.

Cependant, cette conception expérimentale ne permet pas de confirmer si le Bisphénol A induit directement une augmentation de l'expression du récepteur CXCR4, puisque le $TNF-\alpha$, une cytokine inflammatoire majeure dont la sécrétion est augmentée par le Bisphénol A (Benachour et Aris, 2009), peut augmenter l'expression du récepteur CXCR4 (Zhao *et al.*, 2010). Il est donc possible que l'augmentation de l'expression du récepteur CXCR4 soit causé par l'augmentation de la sécrétion du $TNF-\alpha$, elle-même causée par le BPA, et non pas directement par le BPA.

Le cinquième objectif de cette étude était d'évaluer la modification du potentiel migratoire des cellules placentaires par le BPA. Pour ce faire un modèle d'exposition au BPA de cellules placentaires ainsi qu'une chambre Boyden ont été utilisés.

Au cours de cette étude, une augmentation de la concentration en CXCL12 dans le sérum maternel a été observée. Comme discuté au deuxième objectif, une augmentation de l'expression du récepteur CXCR4 dans les cellules placentaires et une augmentation de la concentration sérique en CXCL12 sont observées dans les cas de prééclampsie. Finalement, cette même augmentation est observée lorsque des cytotrophoblastes isolés à partir de grossesses sans complication sont exposées à une concentration de Bisphénol A similaire à ce qui est retrouvé dans le placenta provenant de grossesses compliquées par la prééclampsie.

Afin de voir si l'exposition au Bisphénol A peut conduire à une augmentation de la migration cellulaire au travers de l'augmentation de la signalisation de l'axe CXCR4 – CXCL12, nous avons mené une expérimentation à l'aide d'une chambre de Boyden. Il apparaît que l'exposition au Bisphénol A peut conduire à une augmentation la migration des cytotrophoblastes, alors qu'un antagoniste sélectif de CXCR4, tel que AMD3100 peut abroger cette migration accrue.

Le Bisphénol A pourrait donc modifier à la hausse le potentiel migratoire des cellules placentaires et par le fait même participer au développement de la prééclampsie en augmentant la signalisation de l'axe CXCR4 – CXCL12. Ce faisant, le Bisphénol A facilite la migration des cellules placentaires dans la circulation maternelle ; un phénomène connu dans la prééclampsie et qui est suspecté d'exacerber la dysfonction endothéliale observée.

Le sixième objectif était de déterminer par quel mécanisme le Bisphénol A entraîne un effet apoptotique sur les cellules placentaires. Comme discuté précédemment une augmentation de l'expression du récepteur ERR γ est observée dans les échantillons placentaires obtenus à terme d'une grossesse compliquée par la prééclampsie. Lorsque des cellules placentaires isolées à partir de grossesses sans complication sont exposée au Bisphénol A, une

augmentation de l'expression du récepteur $ERR\gamma$ est aussi observée ce qui suggère une implication possible du Bisphénol A dans l'augmentation de l'expression de récepteur observée dans les biopsies.

Il est aussi connu que le Bisphénol A induit une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose cellulaire (Benachour et Aris, 2009 ; Morice *et al.*, 2011), deux phénomènes aussi attribués au récepteur $ERR\gamma$ (Luo *et al.*, 2014).

Afin de vérifier la possibilité que l'effet antiprolifératif du Bisphénol A soit associé à $ERR\gamma$, nous avons atténué l'expression du récepteur $ERR\gamma$ dans des cellules placentaires isolées à partir de grossesses sans complication grâce à des petits ARN interférants. Une fois fait, nous avons observé que les cellules dont le gène $ERR\gamma$ est atténué ne sont plus sensibles à l'exposition au Bisphénol A. Dans les faits, une augmentation non significative de la prolifération cellulaire en comparaison avec des cellules témoins est observée lors d'une exposition au Bisphénol A. Il est possible que cette tendance à la prolifération soit un résultat de l'absence de contre-effet du récepteur $ERR\gamma$ à l'activation du récepteur $ER\alpha$, favorisant la prolifération par le Bisphénol A dans les cytotrophoblastes.

Afin de vérifier si l'effet antiprolifératif du BPA associé au récepteur $ERR\gamma$ pourrait avoir un lien avec le $TNF-\alpha$, une molécule largement exprimée dans la prééclampsie (Keelan et Mitchell, 2007) et dont l'expression est augmentée par le BPA (Benachour et Aris, 2009), nous avons effectué une expérience de type temps dépendant en parallèle. Il est apparu que l'augmentation de l'expression du récepteur $ERR\gamma$ précède l'augmentation de l'expression, voire la sécrétion du $TNF-\alpha$. Cette observation pourrait suggérer que la Bisphénol A est partiellement impliquée dans la sécrétion de $TNF-\alpha$ dans les cellules placentaires grâce à sa capacité à maintenir l'activation du récepteur $ERR\gamma$.

Enfin, afin de déterminer si l'effet antiprolifératif est associé au $TNF-\alpha$, nous avons atténué l'effet du $TNF-\alpha$ avec l'anticorps *Infliximab*TM. Après l'atténuation de l'effet du $TNF-\alpha$, les cellules placentaires isolées à partir de placenta provenant de grossesses à terme sans complication ne sont plus sensibles à l'exposition au Bisphénol A. Cependant, il est

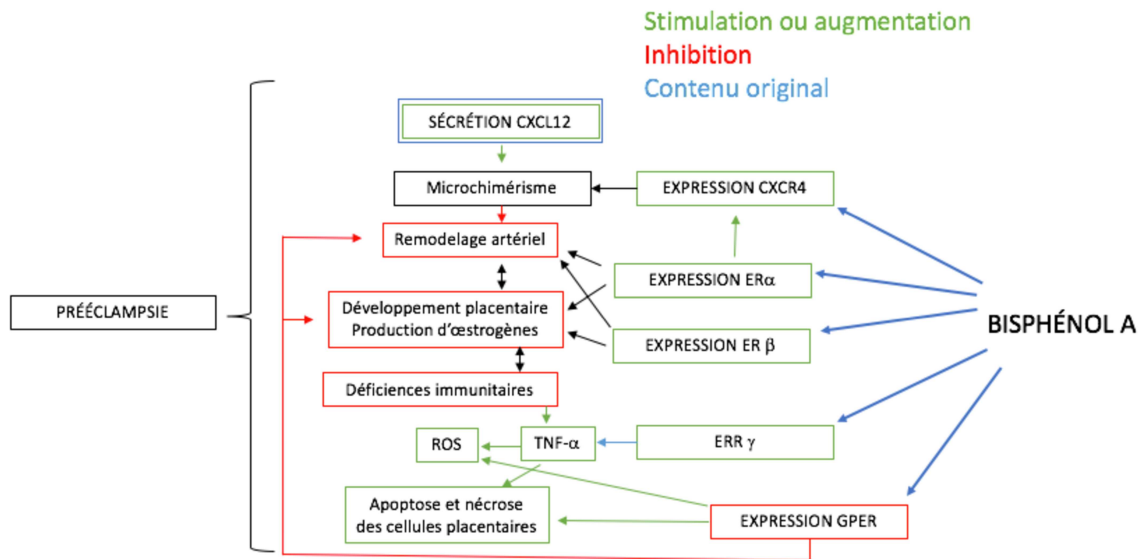
important de noter que la voie par laquelle $ERR\gamma$ induit l'augmentation de l'expression du $TNF-\alpha$ n'a pas été étudiée.

Le dernier objectif était de déterminer la capacité d'un anticorps à contrer les effets toxiques du Bisphénol A sur les cellules placentaires. Pour y arriver, un modèle d'exposition des cellules placentaires au Bisphénol A ainsi qu'une méthode d'évaluation de la viabilité cellulaire ont été utilisés.

Lors de cette étude nous avons observé que dans un modèle *in vitro*, il est possible de diminuer les effets antiprolifératifs de l'exposition au Bisphénol A sur des cellules placentaires. Ces résultats ouvrent la porte à un moyen de limiter les effets du Bisphénol A dans des conditions où l'exposition au BPA est critique comme dans les cas de prééclampsie grave. De plus, si un anticorps est en mesure de diminuer les effets antiprolifératifs du Bisphénol A, il est possible d'avancer l'hypothèse que l'utilisation d'un tel anticorps pourrait aussi limiter l'effet du Bisphénol A sur l'expression des récepteurs de l'œstrogène et du récepteur CXCR4 considérant que les effets du BPA passe par une modification de l'expression des récepteurs de l'œstrogène.

Figure 20

Schéma récapitulatif de l'effet du Bisphénol A sur les récepteurs des œstrogènes et son rôle potentiel dans la prééclampsie.



CONCLUSION

En conclusion, les divers travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont permis de dresser un portrait de l'expression des récepteurs de l'œstrogène dans le placenta et observer des différences d'expression entre le groupe témoin et les femmes dont la grossesse a été compliquée par la prééclampsie. De plus, ces travaux ont permis de mettre en évidence, une modification de l'expression du récepteur CXCR4 chez les femmes dont la grossesse fut compliquée par la prééclampsie.

Ces travaux confirment une accumulation plus importante du Bisphénol A dans le placenta de femme dont la grossesse fut compliquée par la prééclampsie. De plus, ces travaux ont démontré que l'exposition de cellules placentaires au Bisphénol A entraîne une modification de l'expression des récepteurs de l'œstrogène et du récepteur CXCR4 similaire à celle que l'on retrouve *in vivo* dans les biopsies placentaires. L'exposition de cellules placentaires au BPA semble aussi modifier le potentiel migratoire et pourrait être impliquée dans le microchimérisme observé dans le cadre de la prééclampsie.

De plus, il est apparu, que le maintien de l'activité du récepteur $ERR\gamma$ par le BPA serait possiblement associé à l'augmentation de l'expression du $TNF-\alpha$ et que ce maintien de l'activité serait associé à l'effet apoptotique du BPA. Finalement, dans le même modèle de cellules primaires, l'ajout d'un anticorps semble être en mesure de contrer les effets cytotoxiques du BPA.

Donc cela suggère que le Bisphénol A accumulé dans le placenta de femmes dont la grossesse est compliquée par la prééclampsie a la capacité d'induire des modifications de l'expression des récepteurs de l'œstrogène et du récepteur CXCR4 de manière à jouer un rôle dans le développement de la prééclampsie.

PERSPECTIVES

En guise de perspectives, cette étude pave la voie à plusieurs avenues de recherche concernant les mécanismes de détoxification du Bisphénol A tel que celui de l'UGT et son enzyme antagoniste, la bêta-glucuronidase, afin de comprendre pourquoi le Bisphénol A s'accumule significativement dans le placenta de femmes dont la grossesse est compliquée par la prééclampsie.

De plus, cette étude pave la voie à des projets de recherche concernant la capacité d'un anticorps à limiter les effets du Bisphénol A sur la modification de l'expression des récepteurs de l'œstrogène et du récepteur CXCR4 dans le cadre de pathologies de type œstrogéno-dépendantes.

RÉFÉRENCES

- A Keelan, J., & D Mitchell, M. (2007). Placental cytokines and preeclampsia. *Frontiers in Biosciences*, 12(7), 2706–2727.
- Al-Mulhim, A.-A., Abu-Heija, A., Al-Jamma, F., & El-Harith, E.-H. A. (2003). Pre-eclampsia: maternal risk factors and perinatal outcome. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 18(4), 275–280. <https://doi.org/70809>
- Aris, A. (2014a). A 12-year cohort study on adverse pregnancy outcomes in Eastern Townships of Canada: impact of endometriosis. *Gynecological Endocrinology : The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 30(1), 34–7. <https://doi.org/10.3109/09513590.2013.848425>
- Aris, A. (2014b). Estimation of Bisphenol A (BPA) concentrations in pregnant women, fetuses and nonpregnant women in Eastern Townships of Canada. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 45, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.12.006>
- Aris, A., Benali, S., Ouellet, A., Moutquin, J. M., & Leblanc, S. (2009). Potential biomarkers of preeclampsia: inverse correlation between hydrogen peroxide and nitric oxide early in maternal circulation and at term in placenta of women with preeclampsia. *Placenta*, 30(4), 342–7. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.01.003>
- Avissar-whiting, M., Veiga, K., Uhl, K., Maccani, M., Gagne, L., & Marsit, C. J. (2011). Bisphenol A Exposure Leads to Specific MicroRNA Alterations in Placental Cells. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 29(4), 401–406. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.04.004>. Bisphenol
- Barton, J. R., & Sibai, B. M. (2008). Prediction and prevention of recurrent preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology*, 112(2 Pt 1), 359–72. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e3181801d56>
- Bartsch, E., Medcalf, K. E., Park, A. L., & Ray, J. G. (2016). Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy: systematic review and meta-analysis of large cohort studies. *Bmj*, i1753. <https://doi.org/10.1136/bmj.i1753>
- Bell, M. J. (2010). A historical overview of preeclampsia-eclampsia. *JOGNN - Journal of Obstetric, Gynecologic, and Neonatal Nursing*, 39(5), 510–518. <https://doi.org/10.1111/j.1552-6909.2010.01172.x>

- Benachour, N., & Aris, A. (2009). Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 241(3), 322–328.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.09.005>
- Bukovsky, A., Caudle, M. R., Cekanova, M., Fernando, R. I., Wimalasena, J., Foster, J. S., ... Elder, R. F. (2003). Reproductive Biology and Endocrinology Placental expression of estrogen receptor beta and its hormone binding variant – comparison with estrogen receptor alpha and a role for estrogen receptors in asymmetric division and. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 21, 1-36.
- C. Robins, J., J. Marsit, C., F. Padbury, J., & S. Sharma, S. (2011). Endocrine disruptores, environmental oxygen, epigenetics and pregnancy. *Frontiers in Biosciences*, 3, 690–700.
- Cantonwine, D., Meeker, J. D., Hu, H., Sánchez, B. N., Lamadrid-Figueroa, H., Mercado-García, A., ... Téllez-Rojo, M. M. (2010). Bisphenol a exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study. *Environmental Health : A Global Access Science Source*, 9(1), 62. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-9-62>
- Cao, X.-L., Zhang, J., Goodyer, C. G., Hayward, S., Cooke, G. M., & Curran, I. H. a. (2012). Bisphenol A in human placental and fetal liver tissues collected from Greater Montreal area (Quebec) during 1998-2008. *Chemosphere*, 89(5), 505–11.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.003>
- Chaiworapongsa, T., Chaemsaitong, P., Korzeniewski, S. J., Yeo, L., & Romero, R. (2014). Pre-eclampsia part 2: prediction, prevention and management. *Nature Reviews. Nephrology*, 10(9), 531–540. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.103>
- Chen, L. M., Liu, B., Zhao, H. B., Stone, P., Chen, Q., & ChamLey, L. (2010). IL-6, TNFalpha and TGFbeta promote nonapoptotic trophoblast deportation and subsequently causes endothelial cell activation. *Placenta*, 31(1), 75–80.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.11.005>
- Collier, A. C., Ganley, N. A., Tingle, M. D., Blumenstein, M., Marvin, K. W., Paxton, J. W., ... Keelan, J. A. (2002). UDP-glucuronosyltransferase activity, expression and cellular localization in human placenta at term. *Biochemical Pharmacology*, 63(3), 409–419. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00890-5](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00890-5)
- Deblois, G., & Giguère, V. (2013). Oestrogen-related receptors in breast cancer: control of

- cellular metabolism and beyond. *Nature Reviews. Cancer*, 13(1), 27–36.
<https://doi.org/10.1038/nrc3396>
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., & Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399(June), 601–605. <https://doi.org/10.1038/21224>
- Edlow, A. G., Chen, M., Smith, N. A., Lu, C., & McElrath, T. F. (2012). Fetal bisphenol A exposure: concentration of conjugated and unconjugated bisphenol A in amniotic fluid in the second and third trimesters. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 34(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.03.009>
- Elliott, S. E., Parchim, N. F., Liu, C., Xia, Y., Kellems, R. E., Soffici, A. R., & Daugherty, P. S. (2014). Characterization of antibody specificities associated with preeclampsia. *Hypertension*, 63(5), 1086–1093.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02362>
- Founds, S. A., Conley, Y. P., Lyons-weiler, J. F., Jeyabalan, A., Hogge, W. A., & Conrad, K. P. (2009). Altered Global Gene Expression in First Trimester Placentas of Women Destined to Develop Preeclampsia. *Placenta*, 30(1), 15–24.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.09.015>
- Gargett, C. E., Zaitseva, M., Bucak, K., Chu, S., Fuller, P. J., & Rogers, P. A. (2002). 17beta-Estradiol Up-Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Expression in Human Myometrial Microvascular Endothelial Cells: Role of Estrogen Receptor-alpha and -beta. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 87(9), 4341–4349.
<https://doi.org/10.1210/jc.2001-010588>
- Gouvernement du Canada. (2010). Décret modifiant l’annexe I de la Loi sur les produits dangereux (bisphénol A). *Gazette Du Canada*, 144(7).
- Gouvernement du Canada. (2014). Bisphénol A. Retrieved July 17, 2017, from <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/aliments-nutrition/salubrite-aliments/materiaux-emballage/bisphenol.html>
- Gude, N. M., Roberts, C. T., Kalionis, B., & King, R. G. (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research*, 114(5–6), 397–407.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.06.038>
- Hanaoka, T., Kawamura, N., Hara, K., & Tsugane, S. (2002). Urinary bisphenol A and

- plasma hormone concentrations in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents. *Occupational and Environmental Medicine*, 59(9), 625–8. <https://doi.org/10.1136/oem.59.9.625>
- Haram, K., Mortensen, J. H., & Nagy, B. (2014). Genetic aspects of preeclampsia and the HELLP syndrome. *Journal of Pregnancy*, 2014, 910751. <https://doi.org/10.1155/2014/910751>
- Hertig, A., & Liere, P. (2010). New markers in preeclampsia. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 411(21–22), 1591–5. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.07.020>
- Hung, T.-H., Charnock-Jones, D. S., Skepper, J. N., & Burton, G. J. (2004). Secretion of Tumor Necrosis Factor- α from Human Placental Tissues Induced by Hypoxia-Reoxygenation Causes Endothelial Cell Activation in Vitro. *The American Journal of Pathology*, 164(3), 1049–1061. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63192-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63192-6)
- Hung, T. H., Skepper, J. N., & Burton, G. J. (2001). In vitro ischemia-reperfusion injury in term human placenta as a model for oxidative stress in pathological pregnancies. *The American Journal of Pathology*, 159(3), 1031–43. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61778-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61778-6)
- Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, Y., Kamei, Y., & Taketani, Y. (2002). Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 17(11), 2839–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407035>
- Jiménez-Díaz, I., Zafra-Gómez, a, Ballesteros, O., Navea, N., Navalón, a, Fernández, M. F., ... Vílchez, J. L. (2010). Determination of Bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(32), 3363–9. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.10.021>
- Jones, C. J. P., Choudhury, R. H., & Aplin, J. D. (2015). Tracking nutrient transfer at the human maternofetal interface from 4 weeks to term. *Placenta*, 36(4), 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.01.002>
- Kanda, N., & Watanabe, S. (2003). 17-Estradiol Inhibits Oxidative Stress-Induced

- Apoptosis in Keratinocytes by Promoting Bcl-2 Expression. *Journal of Investigative Dermatology*, 121(6), 1500–1509. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1747.2003.12617.x>
- Kaufmann, P., Black, S., & Huppertz, B. (2003). Endovascular Trophoblast Invasion: Implications for the Pathogenesis of Intrauterine Growth Retardation and Preeclampsia. *Biology of Reproduction*, 69(1), 1–7. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.014977>
- Kayisli, U. A., Selam, B., Guzeloglu-Kayisli, O., Demir, R., & Arici, A. (2003). Human Chorionic Gonadotropin Contributes to Maternal Immunotolerance and Endometrial Apoptosis by Regulating Fas-Fas Ligand System. *The Journal of Immunology*, 171(5), 2305–2313. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.5.2305>
- KLIMAN, H. J., NESTLER, J. E., SERMASI, E., SANGER, J. M., & STRAUSS, J. F. (1986). Purification, Characterization, and in vitro Differentiation of Cytotrophoblasts from Human Term Placentae. *Endocrinology*, 118(4), 1567–1582. <https://doi.org/10.1210/endo-118-4-1567>
- Kubarek, Ł., & Jagodzinski, P. P. (2007). Epigenetic up-regulation of CXCR4 and CXCL12 expression by 17 beta-estradiol and tamoxifen is associated with formation of DNA methyltransferase 3B4 splice variant in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. *FEBS Letters*, 581(7), 1441–8. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.02.070>
- Kumar, P., Kamat, A., & Mendelson, C. R. (2009). Estrogen Receptor α (ER α) Mediates Stimulatory α Effects of Estrogen on Aromatase (CYP19) Gene Expression in Human Placenta. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 23(6), 784–793. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0371>
- Lager, S., & Powell, T. L. (2012). Regulation of nutrient transport across the placenta. *Journal of Pregnancy*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/179827>
- Laivuori, H. (2007). Genetic aspects of preeclampsia Hannele. *Frontiers in Biosciences*, 63(12), 2372–2382.
- Leclerc, F., Dubois, M.-F., & Aris, A. (2014). Maternal, placental and fetal exposure to bisphenol A in women with and without preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*, 33(3), 341–8. <https://doi.org/10.3109/10641955.2014.892607>
- Levin, E. R. (2009). Plasma membrane estrogen receptors. *Trends in Endocrinology and*

- Metabolism*, 20(10), 477–482. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.06.009>
- Li, J., Chen, Z., Zhou, X., Shi, S., Qi, H., Baker, P. N., & Zhang, H. (2016). Imbalance between proliferation and apoptosis-related impaired GPR30 expression is involved in preeclampsia. *Cell and Tissue Research*, (1). <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2466-y>
- Luo, Y., Kumar, P., Chen, C.-C., Latham, J., Wang, L., Tudela, C., ... Mendelson, C. R. (2014). Estrogen-related receptor γ serves a role in blood pressure homeostasis during pregnancy. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 28(6), 965–75. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1003>
- Luo, Y., Kumar, P., & Mendelson, C. R. (2014). Estrogen-Related Receptor γ (ERR γ) Regulates Oxygen-Dependent Expression of Voltage-gated Potassium (K⁺) Channels and Tissue Kallikrein during Human Trophoblast Differentiation, 27(April), 940–952. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1038>
- Lyall, F., Bulmer, J. N., Duffie, E., Cousins, F., Theriault, A., & Robson, S. C. (2001). Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of PECAM-1 in normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction. *The American Journal of Pathology*, 158(5), 1713–21. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64127-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64127-2)
- M. Busillo, J., & L. Benovic, J. (2008). Regulation of CXCR4 Signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768(4), 952–963.
- Magee, L. a, Pels, a, Helewa, M., Rey, E., von Dadelszen, P., Hypertension Guideline, C., ... Sebbag, I. (2014). Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy: executive summary. *J Obstet Gynaecol Can*, 36(5), 416–438. [https://doi.org/10.1016/S1701-2163\(15\)30588-0](https://doi.org/10.1016/S1701-2163(15)30588-0)
- Malek, A., Sager, R., & Schneider, H. (2001). Effect of hypoxia, oxidative stress and lipopolysaccharides on the release of prostaglandins and cytokines from human term placental explants. *Placenta*, 22(SUPPL.1), 45–50. <https://doi.org/10.1053/plac.2001.0635>
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*, 129(7), 1261–1274. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>
- Maruyama, A., Nakayama, T., Sato, N., Mizutani, Y., Furuya, K., & Yamamoto, T. (2004). Association Study Using Single Nucleotide Polymorphisms in the Estrogen Receptor

- β (ESR2) Gene for Preeclampsia. *Hypertension Research*, 27(12), 903–909.
<https://doi.org/10.1291/hypres.27.903>
- Matthiesen, L., Berg, G., Ernerudh, J., Ekerfelt, C., Jonsson, Y., & Sharma, S. (2005). Immunology of Preeclampsia. *Chemical Immunology and Allergy*, 89, 49–61.
<https://doi.org/10.1159/000087912>
- Minegishi, T., Nakamura, M., Abe, K., Tano, M., Andoh, A, Yoshida, M., ... Kangawa, K. (1999). Adrenomedullin and atrial natriuretic peptide concentrations in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Molecular Human Reproduction*, 5(8), 767–70.
 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10421805>
- Molvarec, A., Vér, A., Fekete, A., Rosta, K., Derzbach, L., Derzsy, Z., ... Rigó, J. (2007). Association between estrogen receptor alpha (ESR1) gene polymorphisms and severe preeclampsia. *Hypertension Research : Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*, 30(3), 205–11. <https://doi.org/10.1291/hypres.30.205>
- Morice, L., Benaîtreau, D., Dieudonné, M.-N., Morvan, C., Serazin, V., de Mazancourt, P., ... Dos Santos, E. (2011). Antiproliferative and proapoptotic effects of bisphenol A on human trophoblastic JEG-3 cells. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 32(1), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.05.003>
- Myatt, L., & Webster, R. P. (2009). Vascular biology of preeclampsia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 7(3), 375–84. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03259.x>
- Nahar, M. S., Liao, C., Kannan, K., & Dolinoy, D. C. (2013). Fetal Liver Bisphenol A Concentrations and Biotransformation Gene Expression Reveal Variable Exposure and Altered Capacity for Metabolism in Humans, 27(2), 116–123.
<https://doi.org/10.1002/jbt>
- Peraçoli, M. T. S., Menegon, F. T. F., Borges, V. T. M., de Araújo Costa, R. A., Thomazini-Santos, I. A., & Peraçoli, J. C. (2008). Platelet aggregation and TGF-beta1 plasma levels in pregnant women with preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology*, 79(1), 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2008.08.001>
- Perry, D. J., Yin, Y., Telarico, T., Baker, H. V, Dozmorov, I., Perl, A., & Morel, L. (2012). Murine lupus susceptibility locus Sle1c2 mediates CD4+ T cell activation and maps to estrogen-related receptor γ . *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(2),

- 793–803. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200411>
- Poidatz, D., Dos Santos, E., Brulé, a, De Mazancourt, P., & Dieudonné, M. N. (2012). Estrogen-related receptor gamma modulates energy metabolism target genes in human trophoblast. *Placenta*, 33(9), 688–95. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.06.002>
- Prouillac, C., & Lecoœur, S. (2010). The role of the placenta in fetal exposure to xenobiotics: Importance of membrane transporters and human models for transfer studies. *Drug Metabolism and Disposition*, 38(10), 1623–1635. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.033571>
- Rabineau, D., Dupont, J.-M., & Plateau, P. (2014). France : SFRS Service du Film de Recherche Scientifique.
- Ray, P., Lewin, S. A., Mihalko, L. A., Leshner-Perez, S., Takayama, S., Luker, K. E., & Luker, G. D. (2012). Secreted CXCL12 (SDF-1) forms dimers under physiological conditions. *Biochemical Journal*, 442(2), 433–442. <https://doi.org/10.1042/BJ20111341>
- Roberts, J. M., & Gammill, H. S. (2005). Preeclampsia: recent insights. *Hypertension*, 46(6), 1243–9. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000188408.49896.c5>
- Roberts, J. M., & Hubel, C. A. (2009). The Two Stage Model of Preeclampsia: Variations on the Theme. *Placenta*, 30(SUPPL.), 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.11.009>
- Sadler, T. W. (2012). Langman's Medical embryology 12th edit., Lippincott Williams & Wilkins, 232–259.
- Salvucci, O., Yao, L., Villalba, S., Pittaluga, S., & Tosato, G. (2002). Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood*, 99(8), 2703–2711. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.8.2703>
- Sargent, J. L., Johansen, M., & Redman Nuffield, C. W. G. (1996). Trophoblast Deportation in Pre-eclampsia and Normal Pregnancy. *Placenta*, 17(5–6), A31.
- Schanz, A., Baston-Bust, D., Krussel, J. S., Heiss, C., Janni, W., & Hess, A. P. (2011). CXCR7 and syndecan-4 are potential receptors for CXCL12 in human cytotrophoblasts. *Journal of Reproductive Immunology*, 89(1), 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.01.016>
- Schiessl, B., Mylonas, I., Hantschmann, P., Kuhn, C., Schulze, S., Kunze, S., ... Jeschke,

- U. (2005). Expression of endothelial NO synthase, inducible NO synthase, and estrogen receptors alpha and beta in placental tissue of normal, preeclamptic, and intrauterine growth-restricted pregnancies. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 53(12), 1441–9. <https://doi.org/10.1369/jhc.4A6480.2005>
- Schönfelder, G., Friedrich, K., Paul, M., & Chahoud, I. (2004). Developmental Effects of Prenatal Exposure to Bisphenol A on the Uterus of Rat Offspring. *Neoplasia*, 6(5), 584–594. <https://doi.org/10.1593/neo.04217>
- Schönfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C. E., Paul, M., & Chahoud, I. (2002). Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environmental Health Perspectives*, 110(11), A703–7. <https://doi.org/10.1289/ehp.021100703>
- Schultz, J. R., Petz, L. N., & Nardulli, A. M. (2003). Estrogen receptor α and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 201(1–2), 165–175. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00415-X](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00415-X)
- Selam, B., Kayisli, U. A., Mulayim, N., & Arici, A. (2001). Regulation of Fas Ligand Expression by Estradiol and Progesterone. *biology of reproduction*, 65, 979–985.
- Sharma, D., Singh, A., Trivedi, S. S., & Bhattacharjee, J. (2011). Role of Endothelin and Inflammatory Cytokines in Pre-eclampsia - A Pilot North Indian Study. *American Journal of Reproductive Immunology*, 65(4), 428–432. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00903.x>
- Sibai, B., Dekker, G., & Kupferminc, M. (2005). Pre-eclampsia. *The Lancet*, 365, 785–99.
- Sibai, B. M. (2003). Diagnosis and Management of Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Obstetrics & Gynecology*, 102(1), 181–192. [https://doi.org/10.1016/S0029-7844\(03\)00475-7](https://doi.org/10.1016/S0029-7844(03)00475-7)
- Su, E. J., Lin, Z. H., Zeine, R., Yin, P., Reierstad, S., Innes, J. E., & Bulun, S. E. (2009). Estrogen receptor-beta mediates cyclooxygenase-2 expression and vascular prostanoid levels in human placental villous endothelial cells. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 200(4), 427.e1–427.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2009.01.025>
- Sugiura-ogawara, M., Ozaki, Y., Sonta, S., Makino, T., & Suzumori, K. (2005). Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage, 20(8), 2325–2329.

<https://doi.org/10.1093/humrep/deh888>

- Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L., & Pei, G. (2002). β -arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49212–49219.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M207294200>
- Swedenborg, E., Power, Æ. K. A., Cai, W., & Pongratz, Æ. I. (2009). Regulation of estrogen receptor beta activity and implications in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 3873–3894. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0118-z>
- Takeda, Y., Liu, X., Sumiyoshi, M., Matsushima, A., Shimohigashi, M., & Shimohigashi, Y. (2009, July). Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERR{gamma} among the human reproductive tissues: Predominant expression of type-1 ERRgamma isoform. *Journal of Biochemistry*. 146(1), 113-122
<https://doi.org/10.1093/jb/mvp049>
- Takeuchi, T., & Tsutsumi, O. (2002). Serum bisphenol a concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(1), 76–78. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6407>
- Takeuchi, T., Tsutsumi, O. S., Ikezuki, Y. U., Takai, Y. A., & Taketani, Y. U. J. I. (2004). Positive Relationship between Androgen and the Endocrine Disruptor , Bisphenol A , in Normal Women and Women with Ovarian Dysfunction, 51(2), 165–169.
- Tiraby, C., Hazen, B. C., Gantner, M. L., & Kralli, a. (2011). Estrogen-Related Receptor Gamma Promotes Mesenchymal-to-Epithelial Transition and Suppresses Breast Tumor Growth. *Cancer Research*, 71(7), 2518–2528. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1315>
- Tuffnell, D. J., Jankowicz, D., Lindow, S. W., Lyons, G., Mason, G. C., Russell, I. F., & Walker, J. J. (2005). Outcomes of severe pre-eclampsia/eclampsia in Yorkshire 1999/2003. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 112(7), 875–880. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2005.00565.x>
- Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 24(2), 139–77. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.010>
- Völkel, W., Colnot, T., György A, C., Filser, J. G., Dekant, W., Csanády, G. A, ... Dekant,

- W. (2002). Metabolism and Kinetics of Bisphenol A in Humans at Low Doses Following Oral Administration. *Chemical Research in Toxicology*, 15(10), 1281–1287. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12387626>
- Wu, X., Li, D.-J., Yuan, M.-M., Zhu, Y., & Wang, M.-Y. (2004). The expression of CXCR4/CXCL12 in first-trimester human trophoblast cells. *Biology of Reproduction*, 70(6), 1877–85. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024729>
- Yamada, H., Furuta, I., Kato, E. H., Kataoka, S., Usuki, Y., Kobashi, G., ... Fujimoto, S. (2002). Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 16(6), 735–9. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(02\)00051-5](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(02)00051-5)
- Yin, G., Zhu, X., Guo, C., Yang, Y., Han, T., Chen, L., ... Liang, L. (2013). Differential expression of estradiol and estrogen receptor α in severe preeclamptic pregnancies compared with normal pregnancies. *Molecular Medicine Reports*, 7(3), 981–5. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1262>
- Young, B. C., Levine, R. J., & Karumanchi, S. A. (2010). Pathogenesis of preeclampsia. *Annual Review of Pathology*, 5, 173–92. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102149>
- Yücesoy, G., Özkan, S., Bodur, H., Tan, T., Çalışkan, E., Vural, B., & Çorakçı, A. (2005). Maternal and perinatal outcome in pregnancies complicated with hypertensive disorder of pregnancy: a seven year experience of a tertiary care center. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 273(1), 43–49. <https://doi.org/10.1007/s00404-005-0741-3>
- Yun, Y. (2006). CXCL12 / CXCR4 Expression in Trophoblasts Takes Part in Materno-fetal Immune Tolerance and Vascular Remodeling, 26(4), 466–468. <https://doi.org/10.1007/s>
- Zeisler, H., Jirecek, S., Hohlagschwandtner, M., Knöfler, M., Tempfer, C., & C. Levington, J. (2002). Concentrations of estrogens in patients with preeclampsia. *Wien Klin Wochenschr*, 114(12), 458-461
- Zhao, C., Lu, X., Bu, X., Zhang, N., & Wang, W. (2010). Involvement of tumor necrosis factor- α in the upregulation of CXCR4 expression in gastric cancer induced by *Helicobacter pylori*. *BMC Cancer*, 10, 419. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-419>

ANNEXE 1 : Formulaire de consentement



FORMULAIRE DE CONSENTEMENT A LA RECHERCHE

- Titre de l'étude:** Liens entre prééclampsie, retard de croissance fœtale et maladie cardiovasculaire ultérieure (PERECARD)
- Organisme subventionnaire:**
- Faculté de médecine et CRC Étienne-Lebel
 - Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ)
 - Fondation de recherche sur les maladies infantiles (FRMI)
 - Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC)
- Chercheur responsable:** Dr Aziz Aris, Dépt. Obstétrique-gynécologie
- Collaborateurs:**
- Dr Jean-Marie Moutquin, Dépt. Obstétrique-gynécologie
Dre Annie Ouellet, Dépt. Obstétrique-gynécologie
Dr Jean-Patrice Baillargeon, Dépt. médecine

Vous êtes invitée à participer à un projet de recherche. Le présent document vous renseigne sur les modalités de ce projet de recherche. S'il y a des mots ou des choses que vous ne comprenez pas, n'hésitez pas à poser des questions. Pour participer à ce projet de recherche, vous devrez signer le consentement à la fin de ce document et nous vous en remettrons une copie datée et signée pour vos dossiers.

INTRODUCTION

Au cours du développement normal de la grossesse, le placenta joue un rôle de premier plan dans l'alimentation et la survie du fœtus. Le tissu du placenta qu'on appelle le trophoblaste s'étend du fœtus vers la paroi interne de l'utérus de la mère. Il se fixe sur cette paroi, infiltre et dilate les vaisseaux sanguins destinés à nourrir le fœtus, en sorte qu'une meilleure circulation sanguine soit établie entre la mère et le fœtus.

Il arrive que ces mécanismes fassent défaut chez certaines femmes enceintes et une circulation sanguine déficiente au niveau du placenta s'ensuit. Ceci aurait pour conséquences, de diminuer le transfert de l'oxygène et des nutriments de la mère vers le fœtus et de libérer diverses substances dont certaines endommageraient les artères de la mère et les feraient rétrécir. Ainsi, 3 à 8% des grossesses de plus de 20 semaines se trouvent dans cette situation qui cause une maladie qui s'appelle « la prééclampsie ». Cette maladie qui se manifeste habituellement par de l'hypertension artérielle, de protéines dans les urines et de l'enflure, cause dans 40% des cas un retard de croissance du fœtus que nous appelons « restriction de croissance intrautérine (RCIU) » et la naissance de bébés de petit poids. La prééclampsie représente

également un risque très élevé de développer une maladie cardiovasculaire plus tard dans la vie.

D'où la nécessité d'une telle étude qui a pour objectifs de comprendre les causes et la manière dont s'installe la prééclampsie, afin de la diagnostiquer très tôt et de mieux la prévenir ou la traiter.

Plusieurs questions se posent :

- Qu'est ce qui fait que le placenta de certaines femmes enceintes ne fonctionne pas bien et contribue à l'apparition de maladies telle que la prééclampsie ou la restriction de croissance intra-utérine ?
- Quelle est la nature et le mode d'action de certaines substances produites par le placenta et que nous suspectons être impliquées dans les manifestations de la prééclampsie (i.e. hypertension artérielle, les lésions des reins et les œdèmes) et le retard de croissance fœtale ?
- Qu'est ce qui fait qu'un certain nombre de femmes qui font aujourd'hui la prééclampsie pourraient faire plus tard une maladie cardiovasculaire ?

C'est à ce genre de questions qui n'ont pas encore de réponses satisfaisantes, que vise le projet de recherche pour lequel nous demandons votre collaboration.

DÉROULEMENT DE L'ÉTUDE

Votre participation, si vous acceptez, consiste à permettre aux chercheurs d'obtenir un échantillon de sang à chaque trimestre de votre grossesse. Aussi, lors des échographies de grossesse prévues normalement, nous conserverons des images de votre placenta et fœtus obtenues lors des échographies afin d'étudier les liens entre l'image et les résultats sanguins. De plus, avec votre autorisation nous prélèverons sur le placenta et le cordon ombilical une fois évacués un peu de tissu et du sang qui servira aux analyses en laboratoires de facteurs suspectés être impliqués dans ces maladies.

Si vous deviez avoir une césarienne, avant de refermer l'utérus, l'obstétricien(ne) prélèvera par léger grattage, un échantillon de tissu à l'endroit où le placenta était implanté. Ce tissu s'appelle « lit placentaire » et il est naturellement éliminé dans les jours qui suivent l'accouchement. Ce prélèvement ne rallonge aucunement le temps de l'opération.

Enfin, deux dernières analyses sanguines sont prévues à 12 mois et 24 mois après votre accouchement. Elles pourront être faites à votre domicile par un membre de l'équipe de recherche si vous ne pouvez pas vous rendre à la clinique.

Nous pourrions également vous rappeler une dizaine d'années après pour une autre prise de sang si vous le consentez, ceci nous permettra de suivre l'évolution de votre santé.

Prélèvements sanguins : Un total de 6 prélèvements sera obtenu durant cette étude. Chaque prélèvement de sang consiste en deux tubes de sang soit environ 4 cuillerées à thé au total.

Biopsie du placenta et du cordon ombilical : il s'agit de prélèvements effectués sur la partie qui est habituellement expulsée à la fin de la grossesse. Dans les faits, le placenta est toujours envoyé au laboratoire d'anatomo-pathologie pour analyse. C'est à ce moment que nous prendrons un petit morceau d'environ 10 grammes. Il s'agit donc d'un petit morceau, puisque le placenta pèse généralement environ 500 grammes. Un segment de 10 cm du cordon ombilical sera aussi prélevé. Le résidu du prélèvement sanguin du cordon ombilical (destiné au groupe sanguin) sera aussi recueilli pour être étudié dans ce projet. Ceci nous permettra d'examiner les facteurs que nous étudions à ce niveau, fortement impliqués dans la RCIU. Votre participation nous permettra d'approfondir nos investigations en analysant les modifications maternelles et fœtoplacentaires qui pourraient être associées à la prééclampsie et à la RCIU.

Biopsie du lit placentaire : **(uniquement s'il y a césarienne)** au niveau de la région d'attache du placenta, il y a une zone riche en petits vaisseaux; c'est elle que nous suspectons être le point de départ d'anomalies qui auraient une implication dans ces maladies. C'est à ce point précis que nous prélèverons un peu de tissu qui serait de toute façon éliminé naturellement dans les jours suivants. Pour ce faire, l'obstétricien(ne) grattera délicatement la zone d'implantation du placenta obtiendra ainsi 5 à 10 g de tissu placentaire qui sera placé dans une solution de conservation. Votre participation nous permettra d'identifier au niveau cellulaire et moléculaire des éléments qui peuvent avoir une importance capitale dans la compréhension et la guérison de la prééclampsie et de la RCIU.

RISQUES

Les prélèvements sanguins se font comme à l'habitude dans une veine du bras. Il peut toujours y avoir un léger inconfort durant la prise de sang et parfois une petite ecchymose (bleu) peut apparaître au site du prélèvement.

L'obstétricien(ne) prélève par grattage utérin au moment de la césarienne un échantillon du « lit du placenta ». Ce tissu est naturellement destiné à se résorber dans les jours qui suivent l'accouchement. Le prélèvement de ce tissu ne vous expose à

aucun préjudice. De même, les prélèvements obtenus après l'enlèvement du placenta ne comportent aucun risque.

BÉNÉFICES

Aucun bénéfice personnel n'est à prévoir. Il s'agit exclusivement d'une contribution dans l'avancement de connaissances visant à améliorer les approches diagnostiques, la prévention et le traitement de la prééclampsie et de la RCIU.

PARTICIPATION VOLONTAIRE ET RETRAIT DE L'ÉTUDE

Votre participation à ce projet de recherche est tout à fait volontaire. Vous êtes donc libre d'accepter, tout comme de refuser d'y participer, sans aucun préjudice ou sans que cela nuise aux relations avec votre médecin ou d'autres intervenants.

Toute nouvelle connaissance acquise durant le déroulement du projet qui pourrait affecter votre décision quant à votre participation vous sera communiquée.

Par ailleurs, vous êtes également libre de vous retirer du projet, en tout temps, sur simple avis verbal, sans que vous n'ayez à donner les motifs de votre décision. En pareil cas, vous ne subirez aucun préjudice.

COMPENSATION

Une compensation de \$20 pour les frais de déplacement et de garde vous sera rétribuée pour les prélèvements sanguins prévus à 12 mois, 24 mois et à 10 ans post-accouchement.

CONFIDENTIALITÉ

Les échantillons de sang et de tissu seront identifiés par un code numérique (ceci signifie qu'il sera impossible d'identifier que l'échantillon provient de vous) et conservés durant la période que couvre ce projet, après quoi ils seront détruits. Tous les renseignements sur les participantes de ce projet seront maintenus confidentiels. Seules les personnes associées à cette étude auront accès aux dossiers de recherche des participantes. Ces dossiers seront sous la responsabilité de l'investigateur principal.

Les différents résultats qui seront obtenus, pourront être publiés mais votre nom ne sera jamais mentionné dans aucune publication découlant de cette étude.

PERSONNES RESSOURCES

Si vous avez des questions supplémentaires, quelles qu'elles soient, concernant cette étude ou pour nous communiquer tout changement de numéro de téléphone, vous pouvez rejoindre Dr Aziz Aris

Si vous désirez obtenir de l'information concernant votre participation à ce projet de recherche, vous pouvez rejoindre le secrétariat du Comité d'éthique de la recherche en santé chez l'humain du CHUS et de l'Université de Sherbrooke, qui a évalué et approuvé ce projet de recherche

Si vous avez des questions ou commentaires concernant vos droits en tant qu'utilisateur du CHUS, vous pouvez contacter le Programme d'amélioration de la qualité au CHUS

CONSENTEMENT

J'ai lu les informations qui précèdent dans ce formulaire de consentement. J'ai eu l'occasion de poser des questions et j'ai reçu des réponses satisfaisantes. J'accepte volontairement de participer à l'étude décrite dans ce formulaire de consentement.

Nom du participant (lettres moulées)

Signature du participant

Date

Téléphone (maison)

Téléphone (bureau)

Nom du témoin (lettres moulées)

Signature du témoin

Date

*Nom de la personne qui
consentement
(lettres moulées)*

*Signature de la personne qui obtient le
obtient le consentement*

Date

Aziz Aris

Nom du chercheur (lettres moulées)

Signature du chercheur

Date

CALENDRIER

	Prélèvement Sanguin*	Échographie	Prélèvement de placenta	Prélèvement de cordon	Prélèv. sang de cordon	Prélèv. au lit du placenta
<i>Entre 4-20 semaines*</i>	✓	✓				
<i>Entre 21-30 semaines*</i>	✓	✓				
<i>Entre 31-40 semaines*</i>	✓	✓				
<i>Accouchement</i>			✓	✓	✓	✓ si césarienne
<i>À 12 mois postpartum</i>	✓					
<i>À 24 mois postpartum</i>	✓					
<i>10 ans après l'accouchement</i>	✓					